

Università degli Studi di Firenze  
Dottorato di Ricerca in Oncologia Sperimentale e Clinica  
XXII Ciclo  
(MED/04)

***“STUDIO DI FATTORI BIOMOLECOLARI IN UNA CASISTICA DI  
ADENOCARCINOMI DEL COLON-RETTO PROVENIENTI DALLA  
DIVISIONE DI CHIRURGIA GENERALE ONCOLOGICA-  
DIPARTIMENTO DI ONCOLOGIA (AZIENDA OSPEDALIERA  
UNIVERSITARIA CAREGGI FIRENZE).”***

Tesi di Dottorato di Maria Raffaella Romoli

Il Coordinatore del Corso  
Prof. Massimo Olivotto

Il Responsabile della Ricerca  
Prof.ssa Annarosa Arcangeli

# ***RINGRAZIAMENTI***

Desidero ringraziare coloro che hanno contribuito alla realizzazione di questa tesi:

AICR AIRC e ITT per aver finanziato lo svolgimento di questo progetto

la Dott.ssa Elena Lastraioli (Dipartimento Patologia ed Oncologia Sperimentale e Clinica - Università degli studi di Firenze) dal cui lavoro è nato questo progetto;

il Prof. Renato Moretti, il Dr. Marco Farsi, il Dr. Lapo Bencini e tutto il personale delle sale operatorie della Divisione di Chirurgia Generale Oncologica - Dipartimento di Oncologia (Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze);

il Prof. Francesco Di Costanzo e la Dott.ssa Elisa Giommoni (Struttura Complessa di Oncologia Medica - Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze);

il Dr. Luca Boni (Centro di Coordinamento Sperimentazioni Cliniche - ITT, Firenze).

# *INDICE*

INTRODUZIONE	1
Il cancro del colon-retto	2
Epidemiologia	3
Fattori di rischio	5
Sintomatologia e Diagnosi	11
Classificazione dei carcinomi del colon-retto	12
Fattori prognostici	18
Chemioterapia	19
Target therapy	22
Cancerogenesi molecolare	27
Fattori biomolecolari	30
 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	 32
 Markers di ipossia	 37
Anidrasi carbonica (CAIX)	38
Trasportatore di glucosio (Glut1)	42
 I canali ionici	 45
Il canale hERG	47
 Dati preliminari alla tesi	 54
 SCOPO DELLA TESI	 55
 MATERIALI E METODI	 59
Immunoistochimica	60
Analisi statistica	63
 RISULTATI	 64
hERG1	66
VEGF	76
Glut1	78
CA IX	81
VALUTAZIONE STATISTICA	83
 DISCUSSIONE	 90
 BIBLIOGRAFIA	

# ***INTRODUZIONE***

Il cancro del colon-retto (CC) è la quarta neoplasia maligna viscerale in ordine di frequenza in Europa e negli Stati Uniti (WCR 2008). L'incidenza è ugualmente distribuita tra uomini e donne.

Le neoplasie maligne coloretali sono per la maggior parte rappresentate da adenocarcinomi (95%), come lesioni sessili dell'area rettosigmoidea, oppure come lesioni polipoidi. L'analisi istologica degli adenocarcinomi del colon-retto può evidenziare lesioni più o meno differenziate. In quelle ad alto ed a moderato grado di differenziazione è possibile osservare strutture di tipo ghiandolare, citoarchitettura che si perde nelle lesioni scarsamente differenziate, dove il tumore appare sotto forma di piccoli nidi cellulari infiltranti lo stroma. Altri istotipi meno frequenti sono rappresentati dai carcinomi colloidali, cui appartengono

- i carcinomi ad "anello con castone", il cui peculiare aspetto è dovuto alla elevata produzione di mucina da parte della cellula neoplastica, che relega il nucleo verso la membrana cellulare;
- carcinomi midollari, caratterizzati istologicamente da gruppi di grandi cellule con citoplasma eosinofilo (Rodriguez Bigas MA. et al 2003);
- raramente si riscontrano carcinomi indifferenziati, carcinomi a piccole cellule, carcinomi adenosquamosi e carcinomi a cellule squamose.

Sebbene l'intestino tenue rappresenti oltre il 70% della lunghezza del tratto gastrointestinale, le neoplasie a suo carico sono rare: solo il 3-6% delle patologie neoplastiche dell'apparato gastrointestinale (con prevalenza di lesioni benigne quali adenomi e tumori mesenchimali); le forme maligne più comuni sono rappresentate da adenocarcinomi e carcinoidi del piccolo intestino (vedi tabella 1).

	LESIONI BENIGNE	LESIONI MALIGNI
POLIPI NON NEOPLASTICI	Polipi iperplastici	
	Polipi amartomatosi (giovani, Peutz-Jeghers)	
	Polipi infiammatori	
	Polipi linfoidi	
LESIONI EPITELIALI NEOPLASTICHE	Adenomi	Adenocarcinomi
		Tumori carcinoidi
		Carcinomi della regione anale
LESIONI MESENCHIMALI	Lipomi	Lesioni stromali gastrointestinali (GIST) a vario grado di malignità
	Neuromi	
	Angiomi	
LINFOMI		

Tabella 1: lesioni neoplastiche benigne e maligne dell'intestino tenue e del colon.

## EPIDEMIOLOGIA

Secondo i dati forniti dall'International Agency for Research on Cancer (IARC), il cancro del colon-retto rappresenta la quarta patologia neoplastica, dopo polmone, prostata e stomaco, per la popolazione maschile e la terza patologia neoplastica per la popolazione femminile dopo seno e cervice uterina (WCR 2008).

In Italia la frequenza di diagnosi del cancro del colon-retto, per gli uomini, si assesta al quarto posto con il 13.1%, preceduta da lesioni neoplastiche alla prostata, alla pelle (non melanomi) ed al polmone; mentre per le donne rappresenta la terza malattia oncologica con una frequenza del 11.9%, dopo mammella e tumori non melanomatosi della

cute. I decessi per cancro del colon-retto rappresentano la seconda causa di morte per tumore sia per gli uomini sia per le donne con una frequenza di circa l'11% (dati forniti dal Registro Italiano Tumori). Nell'area coperta dal Registro Tumori della Regione Toscana, per questa patologia tumorale, sono stati diagnosticati, in media ogni 100000 abitanti, 104 nuovi casi e 49 decessi tra la popolazione maschile e 84 nuovi casi e 40 decessi per la popolazione femminile.

L'incidenza e la mortalità crescono all'aumentare dell'età, nonostante ciò l'incidenza rimane sostanzialmente stabile, mentre la mortalità risulta in diminuzione. La sopravvivenza relativa a 5 anni si assesta intorno al 60% per gli uomini e al 63% per le donne, con un lento ma graduale incremento.

#### FATTORI DI RISCHIO

I più importanti fattori di rischio per lo sviluppo del cancro del colon-retto possono essere suddivisi in ambientali e genetici.

Fattori di rischio ambientali:

età e sesso: le neoplasie coloretali sono patologie oncologiche dell'età avanzata, la frequenza aumenta dopo 60 anni e si riscontrano raramente prima dei 50 anni, dove la sex ratio M:F è pari a 1. Con l'aumentare dell'età l'incidenza nella popolazione maschile diventa maggiore rispetto a quella femminile (Edwards BK et al., 2002).

fattori etnici: le neoplasie del colon-retto sono frequenti nei Paesi industrializzati come Europa, America del Nord e Giappone mentre risultano rare in Africa, America del Sud e Asia. Nella patogenesi neoplastica i fattori etnici sono particolarmente evidenti considerando individui, di diversa etnia, residenti nello stesso Paese: negli Stati Uniti d'America, ad esempio, la maggior incidenza e mortalità si riscontrano nella popolazione afroamericana, viceversa i tassi minori si registrano nella comunità ispanica (Jemal A et al., 2002).

categorie occupazionali: lavoratori del settore minerario, petrolifero e conciario mostrano un rischio maggiore a causa dell'esposizione continuata ad agenti cancerogeni (Goldberg MS et al., 2001).

abitudini alimentari: obesità, una dieta ipercalorica ed un eccessivo consumo di grassi animali e carni rosse sono i fattori alimentari correlati ad un incremento del rischio d'insorgenza del tumore (Rose DIP et al., 1986). Studi effettuati hanno dimostrato come individui provenienti da aree a basso rischio sviluppino, nel tempo, lo stesso tasso d'incidenza del paese ospitante, acquisendone le abitudini alimentari (Elder JP et al., 1991). Negli anni '70 fu introdotta l'ipotesi che una dieta ricca di fibre svolgesse un ruolo protettivo nei confronti della malattia neoplastica (Burkitt DP, 1971); successivamente i dati epidemiologici non hanno confermato a pieno questa ipotesi, mentre è ampiamente accertato che una dieta, che privilegi il consumo di frutta e verdure fresche, svolga un ruolo preventivo e diminuisca il rischio di insorgenza. Rodriguez-Bigas (Rodriguez-Bigas MA et al., 2003) ha evidenziato una correlazione inversa tra l'assunzione di calcio e vitamina D e l'insorgenza del tumore al colon-retto; è stato inoltre accertato, da Fuchs e collaboratori, come l'assunzione per lunghi periodi di complessi multivitaminici riduca del 50% il rischio di tumore al grosso intestino, ciò è dovuto in gran parte all'azione dell'acido folico, indispensabile nei processi di sintesi cellulare e riparazione delle molecole di DNA (Fuchs CS et al., 2002). Il consumo eccessivo di alcool è strettamente correlato ad un aumentato rischio di sviluppare una neoplasia coloretale (Longnecker MP et al., 1990), mentre è stata ipotizzata una associazione tra il fumo di sigaretta e lo sviluppo di adenomi e carcinomi, ad opera di polimorfismi nel metabolismo enzimatico (Potter JD, 1999).

terapia ormonale e farmaci antinfiammatori: i dati sul possibile ruolo degli ormoni femminili, in particolare delle terapie ormonali sostitutive, nello sviluppo di neoplasie del colon-retto sono rassicuranti, vari studi hanno infatti dimostrato come, la terapia ormonale sostitutiva riduca

l'incidenza di adenomi e carcinomi coloretali in donne in menopausa (Potter JD, 1999) ed anche l'assunzione di contraccettivi orali riduce l'insorgenza di tali neoplasie (Martinez ME et al., 1997). Gli studi condotti in Italia concordano con i risultati ottenuti in altri Paesi e valutano una riduzione del rischio di circa il 20% in donne in menopausa sottoposte a terapie ormonali. E' stato inoltre evidenziata un'associazione tra l'incidenza del carcinoma coloretale ed obesità; infatti nelle donne in menopausa la principale fonte di estrogeni deriva dalla conversione degli androgeni al livello del tessuto adiposo, in donne obese si possono quindi riscontrare alti livelli ematici di estrogeni, in grado di contrastare l'effetto dell'insulina e determinare un incremento del rischio (Giovannucci E, 2002). Dati ottenuti da circa 15 studi osservazionali sul ruolo dell'acido acetil-salicilico e di anti-infiammatori non steroidei hanno confermato che l'assunzione di questi farmaci è associata ad una riduzione del rischio di cancro del colon-retto di circa il 20-30%. Il principale meccanismo è a carico dell'attività dell'enzima ciclo-ossigenasi (la forma inducibile COX<sub>2</sub>, assente nelle cellule a riposo si attiva nella risposta infiammatoria) la cui attività è importante nella sintesi delle prostaglandine, mediatori della flogosi. Negli anni '90 studi condotti su pazienti affetti da poliposi adenomatosa familiare, avevano dimostrato che la terapia con Sulindac, inibitore delle Ciclo-ossigenasi di tipo 1 e 2, diminuiva numero e dimensioni degli adenomi (Giardiello FM et al., 1993); recentemente è stato dimostrato che analoghi effetti si ottengono dalla somministrazione di Celecoxib, inibitore specifico della COX-2 (Steinbach G et al., 2000).

componenti genetiche: le neoplasie coloretali si suddividono in forme sporadiche e forme familiari (ereditarie), che rappresentano il 20-25% di tutte le forme tumorali del colon-retto. Queste stime sono soggette a notevoli fluttuazioni, se si considerano le parentele di primo, secondo e/o terzo grado (de la Chapelle A, 2004). Tra le condizioni predisponenti all'insorgenza del carcinoma del colon-retto vanno citate



la Poliposi Adenomatosa Familiare (Familial Adenomatous Polyposis - APC) e la Sindrome di Turcot a carico del colon-retto, la Sindrome di Gardner che colpisce anche l'intestino tenue, la Sindrome di Lynch (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer - HNPCC) a carico del colon prossimale ed il retto, come riportato in tabella 2.

	SEDE ANATOMICA	LESIONE	TRASFORMAZIONE NEOPLASTICA
FAP	Colon-retto	Adenoma	comune
S. Turcot	Colon-retto	Adenoma	comune
S. Gardner	Colon-retto, tenue	Adenoma	comune
S. Lynch (HNPCC)	Colon prossimale, retto	Adenoma	comune
S. Peutz- Jeghers	Colon-retto, tenue, stomaco	Amartroma	rara
Poliposi giovanile	Colon-retto, tenue, stomaco	Amartroma *	rara

Tabella 2: sindromi autosomiche dominanti. (\*Lesione che raramente progredisce in adenoma)

Familial Adenomatous Polyposis (FAP): sindrome autosomica dominante con una penetranza stimata attorno al 100%, è responsabile dello 0.2% circa dei carcinomi coloretali (de la Chapelle A, 2004). L'alterazione genetica alla base della FAP è una mutazione germinale a carico del gene oncosoppressore *apc* (adenomatous polyposis coli) localizzato sul cromosoma 5q21, tale mutazione è causa di un ampio spettro di manifestazioni cliniche. La diagnosi (su base endoscopica e con conferma istologica) di FAP è relativamente semplice: l'intero grosso intestino deve essere caratterizzato dalla presenza di numerosi polipi di varie dimensioni, non meno di 100 (sino ad arrivare a migliaia di lesioni che tappezzano letteralmente l'intera mucosa colica); possono essere individuati numerosi adenomi anche in altre zone del tratto

gastro-intestinale, come ad esempio nella regione dell'ampolla di Vater, al livello del duodeno. Dal punto di vista istologico queste lesioni sono adenomi tubulari, meno frequentemente si presentano come adenomi villosi. Di più difficile interpretazione sono i rari casi, in cui si osservano relativamente poche lesioni circa 50 polipi, a volte anche meno, localizzati nel colon prossimale, in questo caso si parla di "Poliposi Attenuata" (AFAP), per i pazienti con AFAP il rischio di sviluppare un carcinoma è del 50%. Il tratto fenotipico non è presente alla nascita, si manifesta intorno al decimo anno di vita; i familiari di primo grado dei pazienti, affetti da FAP, mostrano il 50% di rischio di sviluppare la malattia, pertanto vengono sottoposti a controlli endoscopici, a partire dall'età di 12-16 anni. La colectomia totale con anastomosi ileorettale è il trattamento chirurgico d'elezione e viene eseguito tra 18 e 22 anni. Se non trattata, la poliposi familiare evolve in cancro coloretale praticamente nel 100% dei casi. I pazienti affetti da FAP possono sviluppare altre numerose "manifestazioni extracoloniche" che devono essere diagnosticate e curate nel tempo, tra queste le più importanti sono:

- adenomi del canale alimentare (particolarmente pericolose le lesioni del duodeno, che possono evolvere in carcinomi altamente maligni);
- tumori desmoidi (fibromi che spesso insorgono al livello del mesentere intestinale, del retroperitoneo o su cicatrici di interventi chirurgici e che spesso, pur non metastatizzando, tendono ad infiltrare i tessuti circostanti);
- ipertrofia pigmentaria retinica congenita, caratterizzata da "macchie" di iperpigmentazione al livello della retina, diagnosticabili con un semplice esame del fondo oculare e di natura sostanzialmente benigna;
- osteomi del cranio e della mandibola;
- alterazioni dentarie di vario tipo;

- tumori maligni del fegato (epatoblastoma in 1/150 portatori di mutazione del gene *apc*), dell'albero biliare, del pancreas, dell'encefalo.

Sindrome di Turcot: sindrome rara, in cui ad una poliposi adenomatosa del colon si associano neoplasie del sistema nervoso centrale. Oltre la metà dei pazienti, affetti dalla sindrome di Turcot, presenta mutazioni a carico del gene *apc* con sviluppo di medulloblastomi cerebrali, mentre un terzo dei pazienti presenta mutazioni a carico di uno dei geni associati alla HNPCC con sviluppo di glioblastomi cerebrali.

Sindrome di Gardner: si manifesta come una poliposi intestinale, paragonabile ad una FAP classica, correlata allo sviluppo di osteomi mandibolari, cranici e delle ossa lunghe, di cisti epidermiche e fibromatose. Più raramente si osservano anomalie a carico dell'arcata dentaria e carcinomi tiroidei.

Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer o Sindrome di Lynch (HNPCC): sindrome ereditaria autosomica dominante, dettagliatamente descritta da H.Lynch nel 1977. I pazienti affetti dalla sindrome di Lynch presentano mutazioni germinali a carico di geni del sistema MMR (Mismatch Repair), il 95% di queste mutazioni interessano *hMSH1* (human mutS homologue 1) sul cromosoma 3p21 e *hMSH2* (human mutS homologue 2) sul cromosoma 2p16. Sulla base di analisi sull'instabilità microsatellitare, che si accompagna ai danni di mismatch repair, sono stati modificati alcuni parametri diagnostici che tengono conto dell'insorgenza di adenomi in pazienti con meno di 40 anni; di soggetti con sviluppo di malattia neoplastica al colon o in sede endometriale prima dei 50 anni; pazienti con familiari con diagnosi di cancro coloretale HNPCC correlato (incluse forme sincrone e metacrone). Clinicamente questa sindrome si caratterizza per l'alta incidenza di carcinomi colorettali, dell'endometrio, dello stomaco e di diversi altri tessuti (Lynch HT et al., 1977). Le lesioni adenomatose non

sono numerose e si sviluppano precocemente, mentre i carcinomi sono spesso multipli, ma non derivano da adenomi pre-esistenti. La diagnosi di HNPCC viene effettuata, con test genetici specifici, sulla base dei seguenti criteri (Amsterdam Criteria II): - tre o più parenti con diagnosi accertata di cancro associato a HNPCC, due dei quali legati da parentela di primo grado; - insorgenza di casi di cancro coloretale nelle ultime due generazioni; - uno o più casi di cancro al colon-retto diagnosticati in pazienti con meno di 50 anni. I pazienti affetti da HNPCC devono sottoporsi a colonscopie ogni 2 anni a partire da 25 anni, dopo i 40 anni a frequenza annuale, le donne a rischio devono essere sottoposte, annualmente, a biopsie endometriali ed ecografie transvaginali a partire dai 30 anni. La colectomia subtotale e/o l'isterectomia profilattica sono misure drastiche che devono pertanto essere considerate individualmente e solo in casi di accertata doppia mutazione dei geni MSH1/MSH2/MSH6 e MLH1.

Sindrome di Peutz-Jeghers: sindrome autosomica dominante a carico del gene *STK11* sul cromosoma 19, che codifica per una serina/treonina-chinasi. La sindrome è caratterizzata da polipi amartomatosi al livello gastrico ed intestinale (si veda tabella 2) e pigmentazione melanocitica mucosa e cutanea attorno alle labbra e sul volto. Si associa ad un aumentato rischio di sviluppare tumori coloretali (sede più frequente, Jass JR, 1992), mammari e della cervice uterina. L'analisi istologica rileva una tipica "diramazione arborescente" di fibre di *muscularis mucosae* rivestite da cellule intestinali normali.

Poliposi giovanile: rara sindrome a trasmissione autosomica dominante, spesso a carico del gene *SMAD4* localizzato sul 18q21, che codifica per una molecola coinvolta nella via segnalatoria di TGF- $\beta$ . Nel tratto gastrointestinale si sviluppano numerosi (tra 50 e 100 lesioni) polipi di grosse dimensioni associati ad aree displastiche, che possono facilmente evolvere in adenomi e successivamente in adenocarcinomi.

Patologie predisponenti: **rettocolite ulcerosa** (RCU), patologia ulcerativa ed infiammatoria, della mucosa e sottomucosa del colon, con coinvolgimento continuo in senso prossimale a partire dal retto, a livello genomico è caratterizzata da instabilità dei micro-satelliti. Recentemente è stata dimostrata, in pazienti affetti da rettocolite ulcerosa, la presenza di instabilità microsatellitare in zone di mucosa non displastica (Chen R. et al., 2003), questo rafforza l'ipotesi di un deficit nei meccanismi di riparazione del DNA e di instabilità genomica lungo tutto l'intestino. Nei pazienti affetti da RCU la complicanza più importante è l'insorgere di un carcinoma coloretale. Il rischio deriva dal fatto che lo stato infiammatorio cronico può mascherare clinicamente le lesioni displastiche multifocali e le fasi iniziali della trasformazione neoplastica. Il **Morbo di Crohn** (MC), denominata anche enterite regionale o colite granulomatosa, è una patologia infiammatoria che può colpire ogni livello del tratto gastro-intestinale e che interessa tutti gli strati della parete intestinale e può estendersi anche ai linfonodi regionali e mesenterici. Nei pazienti con MC progressivo si osserva un aumento dell'incidenza di carcinomi del tratto gastrointestinale, sebbene tale rischio risulti inferiore rispetto ai pazienti affetti da RCU. Il **Morbo Celiaco**, definito anche sprue celiaca o enteropatia da glutine, è una patologia autoimmune cronica infiammatoria (linfociti T-mediata) caratterizzata da lesioni della mucosa del tenue e deficit di assorbimento. La sintomatologia ed il quadro clinico variano da paziente a paziente, ma la causa scatenante è l'intolleranza al glutine (gliadina), una proteina non idrosolubile dei cereali come grano, orzo, avena e segale. I pazienti celiaci che seguono un'adeguata dieta priva di glutine possono condurre una vita normale, tuttavia permane un rischio a lungo termine per l'insorgenza di tumori maligni tra i quali adenocarcinomi dell'intestino tenue e carcinomi squamocellulari dell'esofago.

## SINTOMATOLOGIA E DIAGNOSI

Nel colon destro, preposto al riassorbimento di acqua ed elettroliti, la iniziale massa neoplastica non causa ostruzione, poiché la lesione tende a crescere lungo la parete piuttosto che invadere il lume intestinale. La progressione della malattia determina l'insorgenza di un quadro clinico in cui la massa può diventare palpabile e compaiono debolezza, dispnea da sforzo, diarrea, calo ponderale ed altri sintomi riconducibili ad occlusione intestinale. Diversamente nel colon sinistro lo sviluppo del tumore può determinare ostruzioni, anche negli stadi iniziali, associati a rettorragie (spesso confuse con disturbi emorroidari) e crampi. Con l'evoluzione della malattia compaiono altri sintomi come costipazione e diarrea ed un sanguinamento evidente con emissione muco e sangue rosso vivo o scuro nelle feci. Nelle lesioni a carico del retto il primo sintomo è un cambiamento nell'alvo: diarrea mattutina o stipsi ostinata alternata a diarrea, sangue e muco nelle feci. Successivamente il paziente può avvertire un dolore spesso profondo e costante nella zona del retto o nella regione sacrale. La diagnosi di cancro coloretale può essere confermata solo con una indagine biotica, sebbene alcuni esami clinici possano aiutare nell'individuare le lesioni, anche in fasi iniziali.

- ricerca del sangue occulto nelle feci, test non invasivo che rileva l'eventuale sanguinamento dovuto a lesioni ulcerate. Questo test non mostra, tuttavia, alta affidabilità e precisione, poiché si possono avere falsi negativi, se il test viene effettuato durante la fase di non sanguinamento o in presenza di adenomi o di lesioni neoplastiche non ulcerate;
- la proctoscopia o la sigmoidoscopia possono evidenziare oltre il 60% delle lesioni cancerose;
- la coloscopia consente la visualizzazione diretta della mucosa colica sino alla valvola ileo-cecale, è un test diagnostico più affidabile e permette l'asportazione del polipo o della neoplasia per l'esame istologico;

- la tomografia computerizzata è un valido strumento diagnostico per l'individuazione di eventuali metastasi;
- test sierologici: il CEA (Carcino Embryonic Antigen), una glicoproteina appartenente alla famiglia delle immunoglobuline, può essere dosato, prima dell'intervento chirurgico, per la stadiazione della lesione e la programmazione del trattamento. Inoltre è attualmente il parametro più importante per l'individuazione precoce di recidive o di ricomparsa di alcune forme di carcinoma del colon-retto, dopo intervento chirurgico, terapia radiante e/o chemioterapia. I livelli dell'antigene devono normalizzarsi entro 8 settimane dal trattamento chirurgico, il persistere di elevate concentrazioni deve far sospettare una rimozione incompleta della massa o la presenza di metastasi (livelli ematici superiori a 5ng/mL). Possono essere monitorati altri marcatori, meno specifici, come indicatori prognostici, quali il CA19-9, il CA125 ed CA15.

#### CLASSIFICAZIONE DEI CARCINOMI DEL COLON-RETTO

Le neoplasie coloretali possono essere classificate mediante un'osservazione macroscopica, un'analisi istologica ed infine secondo criteri clinico-patologici.

LESIONE	DESCRIZIONE
ESOFITICA/VEGETANTE	proliferazione sessile che protende nel lume intestinale
POLIPOIDE	proliferazione pedunculata, derivante da un adenoma
ENDOFITICA/ULCERATA	prevalente crescita intramurale, anulare con interessamento della parete e stenosi del lume
SCIRROSA	abbondante componente connettivale e rare formazioni ghiandolari

Tabella 3: classificazione macroscopica dei carcinomi colorettali.

ISTOTIPO	DESCRIZIONE
ADENOCARCINOMA	costituito da strutture ghiandolari a vario grado di differenziamento
ADENOCARCINOMA MUCOIDE (o MUCINOSO)	caratterizzato dalla presenza di abbondante muco extracellulare
CARCINOMA A CELLULE CON CASTONE (SIGNET-RING CELL CARCINOMA)	costituito prevalentemente da cellule con castone, contraddistinte da un voluminoso vacuolo intracitoplasmatico (contenente mucina) che disloca alla periferia il nucleo
CARCINOMA MIDOLLARE	caratterizzato da cellule con modesta atipia nucleare e numerosi linfociti intraepiteliali
CARCINOMA INDIFFERENZIATO	
CARCINOMA A PICCOLE CELLULE	
CARCINOMA ADENOSQUAMOSO	
CARCINOMA SQUAMOSO	
SARCOMA/GIST MALIGNO	
LINFOMA	
MELANOMA	

Tabella 4: classificazione istologica dei tumori del colon-retto (WHO-2000).



Gli adenocarcinomi rappresentano oltre l'85% dei casi, gli adenocarcinomi mucoidi sono circa il 10% mentre gli altri istotipi sono meno del 5%, tra questi i carcinomi squamosi ed adenosquamosi sono estremamente rari. I tumori con una componente mucoide inferiore al 50% sono classificati come adenocarcinomi. I carcinomi a cellule con castone e a piccole cellule sono associati ad una prognosi peggiore, mentre i carcinomi midollari, frequentemente di tipo MSI-H, si associano ad una prognosi favorevole. In base alla valutazione microscopica della integrità della componente ghiandolare ed utilizzando i criteri classificativi WHO gli adenocarcinomi vengono suddivisi:

- lesioni ben differenziate;
- lesioni moderatamente differenziate;
- lesioni scarsamente differenziate.

In presenza di un quadro istologico eterogeneo, il grado viene definito dalla componente meno differenziata, con la esclusione dei margini di infiltrazione.

Recentemente il College of American Pathologists ha proposto un sistema di grading in due classi: basso grado: con una componente ghiandolare (a vario grado di differenziamento) maggiore del 50%; alto grado: una componente ghiandolare inferiore al 50%. Gli adenocarcinomi mucoidi, vengono in genere considerati come tumori ad alto grado, anche se la loro associazione con una prognosi sfavorevole non è comprovata, è comunque possibile determinarne il grado di differenziazione: basso grado caratterizzato da accumuli di muco delimitati da epitelio colonnare muco-secrente; alto grado caratterizzato da aggregati irregolari, o singole cellule immerse nel muco e/o presenza di cellule con castone.

Nel 1932 CE Dukes propose, per i tumori del colon-retto, una classificazione che prevedeva quattro stadi in cui suddividere le varie lesioni. Successivamente lo stesso Dukes provvide a modificarla, inserendovi dei sottogruppi (si veda tabella 5). La classificazione secondo Dukes mantiene ancora oggi un valore prognostico importante (Hilska M et al., 2002).

STADIO	SOTTOTIPO	DESCRIZIONE
<b>A</b>		lesione limitata alla parete intestinale
<b>B</b>	<b>B1</b>	estensione non oltre la <i>muscularis propria</i>
	<b>B2</b>	estensione oltre la <i>muscularis propria</i> , linfonodi negativi
<b>C</b>	<b>C1</b>	linfonodi locoregionali positivi
	<b>C2</b>	interessamento linfonodale a distanza
<b>D</b>		metastasi

Tabella 5: Classificazione secondo Dukes (e modifiche successive).

Segue la classificazione secondo Astler e Collier (Astler VB e Collier FA, 1954), con una migliore descrizione delle lesioni, come mostrato in tabella.

STADIO	SOTTOTIPO	DESCRIZIONE
<b>A</b>		lesione limitata alla mucosa
<b>B</b>	<b>B1</b>	assenza di penetrazione <i>muscularis externa</i>
	<b>B2</b>	penetrazione della <i>muscularis externa</i>
<b>C</b>	<b>C1</b>	assenza di penetrazione della parete, linfonodi positivi
	<b>C2</b>	penetrazione della parete, linfonodi positivi
<b>D</b>		metastasi a distanza

Tabella 6: classificazione secondo Astler e Collier (1954).

Nel 1987 Jass (Jass JR et al., 1987) propose una nuova classificazione con diversi parametri a cui attribuire un punteggio, la cui somma determina il gruppo di appartenenza della lesione. I parametri considerati sono - interessamento della parete intestinale; - margine della lesione (espansivo o infiltrante); - infiltrato linfocitario peritumorale; - numero di linfonodi metastatizzati (o, da 1-a, oltre 4). La stadiazione di Jass può risultare un valido strumento per selezionare i pazienti da sottoporre a trattamento chemioterapico adiuvante.

Attualmente il metodo di stadiazione più utilizzato è quello proposto dall'American Joint Commission on Cancer (AJCC), in cui vengono considerati criteri anatomopatologici quali **T**: estensione della lesione; **N**: assenza/presenza di linfonodi negativi; **M**: assenza/presenza di metastasi (vedi tabella 7).

PARAMETRO		DEFINIZIONE
<b>T- tumore primitivo</b>	<b>Tis</b>	carcinoma <i>in situ</i> , intraepiteliale
	<b>T1</b>	infiltrante mucosa o sottomucosa
	<b>T2</b>	limitato <i>muscularis propria</i>
	<b>T3</b>	penetrazione sottosierosa o tessuti pericolici
	<b>T4</b>	invasione altri organi , tessuti e/o peritoneo
<b>N- linfonodi regionali</b>	<b>N0</b>	linfonodi regionali liberi da metastasi
	<b>N1</b>	linfonodi loco-regionali positivi: 1-3
	<b>N2</b>	linfonodi loco-regionali positivi: più di 4
<b>M- metastasi</b>	<b>M0</b>	assenza metastasi a distanza
	<b>M1</b>	presenza metastasi a distanza (*)

Tabella 7: stadiazione TNM (AJCC – VI edizione, 2003). \*Una lesione con linfonodi iliaci esterni positivi viene classificata M1.

Quando una massa tumorale infiltra la parete intestinale e la sierosa, le cellule neoplastiche possono diffondere attraverso il circolo venoso, linfatico e diffondere nel peritoneo. Fegato e linfonodi regionali sono le sedi più comuni per lo sviluppo di una lesione secondaria, metastasi si possono sviluppare a livello ovarico e peritoneale, mentre sono piuttosto rare metastasi al SNC, utero e testicolo.

Di seguito viene riportata una tabella comparativa delle due classificazioni più utilizzate per le neoplasie del colon-retto, stadiazione TNM e stadiazione secondo Dukes (tabella 8).

<b>STADIO</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>DUKES</b>
Stadio 0	Tis	N0	M0	-
Stadio I	T1	N0	M0	<b>A</b>
	T2	N0	M0	<b>A</b>
Stadio IIA	T3	N0	M0	<b>B</b>
Stadio IIB	T4	N0	M0	<b>B</b>
Stadio IIIA	T1-T2	N1	M0	<b>C</b>
Stadio IIIB	T3-T4	N1	M0	<b>C</b>
Stadio IIIC	ogni T	N2	M0	<b>C</b>
Stadio IV	ogni T	ogni N	M1	-
Nota: Lo stadio <b>B</b> di Dukes comprende gruppi di tumori la cui prognosi è più favorevole (T3, N0, M0) e altri a prognosi più sfavorevole (T4, N0, M0), analogamente al Dukes <b>C</b> (ogni T, N1, M0 ed ogni T, N2, M0).				

*Tabella 8: stadiazione TNM e Dukes per tumori del colon-retto.*

I metodi di stadiazione possono tener conto del tipo di trattamento della neoplasia. La terapia chirurgica infatti può essere associata a protocolli di radioterapia, immunoterapia, chemioterapia adiuvante (per prevenire la comparsa di recidive ed eradicare eventuali metastasi, non eliminabili chirurgicamente) o neoadiuvante (per migliorare lo stadio del tumore prima dell'atto chirurgico). L'opportunità di instaurare tali protocolli viene stabilita in base alla sede della lesione ed allo stadio della malattia.

Per quanto riguarda i pazienti con diagnosi di carcinoma rettale, se la stadiazione viene effettuata dopo radioterapia o radio-chemioterapia, le categorie pTNM devono essere precedute dal prefisso "y" ed indicano l'estensione del tumore al momento della valutazione istopatologica. La risposta tumorale alla terapia neoadiuvante sembra essere un importante fattore prognostico e può essere valutata determinando il grado di regressione tumorale (TRG) come proposto nella seguente tabella:

<b>TRG1</b>	residue cellule tumorali (regressione completa)
<b>TRG2</b>	fibrosi prominente con presenza di rare residue cellule tumorali
<b>TRG3</b>	fibrosi prevalente (>50%) sulla residua componente tumorale
<b>TRG4</b>	residua componente tumorale prevalente sulla fibrosi
<b>TRG5</b>	assenza di regressione

*Tabella 9 : regressione tumorale dopo terapia neoadiuvante.*

## FATTORI PROGNOSTICI

La sopravvivenza a 5 anni di un paziente con diagnosi di neoplasia coloretale, dopo intervento chirurgico, oscilla intorno all'85% per pazienti in stadio I e varia tra il 30 ed 80% in pazienti di stadio III. Sebbene lo stadio rimanga il fattore prognostico migliore altri parametri clinico-patologici possono influenzare la prognosi (Rosai J, 1996):

- età: pazienti molto giovani o molto anziani mostrano una prognosi peggiore;
- sesso;
- sede e dimensioni della lesione;
- compromissione tessuti e/o organi adiacenti;
- ostruzione;
- perforazione (prognosi peggiore, in relazione all'estensione della lesione);
- presenza cellule endocrine (maggiore aggressività);
- presenza di antigeni mucine-associati (associati ad un decorso più aggressivo);
- margini della lesione e presenza di infiltrato infiammatorio (prognosi migliore);
- invasione vascolare e perineurale;
- interessamento linfonodale;
- reazione linfonodale (una risposta cellulo-mediata è indice di una prognosi favorevole);

- istotipo colloide, a piccole cellule, ad anello con castone sono caratterizzati da una prognosi peggiore rispetto agli adenocarcinomi;
- stadio di Dukes (la sopravvivenza varia a seconda dello stadio, stadio A-90% *vs* stadio D-5%);
- espressione oncogeni e oncosoppressori;
- proliferazione cellulare;
- MSI (fattore prognostico sfavorevole);
- LOH-18q;
- ploidia (è stata dimostrata una correlazione tra aneuploidia e rischio di recidiva);

## CHEMIOTERAPIA

Nel carcinoma del colon retto i protocolli di chemioterapia possono essere applicati in fase pre-operatoria (**terapia neo-adiuvante**), dopo eradicazione chirurgica (**terapia adiuvante**) o per combattere le fasi avanzate della malattia. Una ulteriore distinzione va fatta per la chemioterapia di prima, seconda e terza linea: nel protocollo di I linea i farmaci vengono somministrati come primo trattamento contro il tumore, quando la malattia risulta non operabile, in forma metastatica o in fase localmente avanzata; diversamente, nel trattamento di II linea i farmaci vengono somministrati a pazienti che hanno già effettuato almeno un precedente ciclo di terapia, mentre nel trattamento di III linea la terapia viene somministrata in presenza di ripresa di malattia dopo precedente risposta. Inoltre, i protocolli chemioterapici possono venire associati a radioterapia ed a terapia con farmaci biologici.

## COLON

L'esecuzione di un protocollo di chemioterapia adiuvante dipende dallo stadio della malattia, non risulta indicato per pazienti in stadio I (Dukes A), mentre non esiste ancora una risposta definitiva circa la necessità di trattamento per pazienti in stadio II (Dukes B2). Ad oggi, infatti, per il trattamento chemio-adiuvante in pazienti con malattia in stadio II viene consigliato l'inserimento in studi clinici controllati, al fine di poter monitorare l'andamento della malattia e la risposta al trattamento, nonché la possibilità di valutarne l'efficacia e gli eventuali effetti collaterali. Secondo le linee guida dell'ASCO ai pazienti con malattia in stadio II, che presentino fattori prognostici sfavorevoli, è corretto proporre un protocollo adiuvante, anche al di fuori di studi clinici, in presenza di lesioni pT4, con alto grado di anaplasia (G3), con perforazione, con invasione vascolare e/o linfatica, nonché con un numero di linfonodi esaminati inadeguato (<13). Inoltre non ci sono ancora indicazioni definitive per poter utilizzare un marcatore biomolecolare come fattore prognostico idoneo alla scelta dei pazienti in stadio II da sottoporre al trattamento adiuvante. Anche per quanto riguarda i protocolli di radioterapia da proporre a pazienti in stadio B2 di Dukes, devono essere considerati idonei solo i soggetti sottoposti ad una corretta escissione del meso-retto, che presentino lesioni con un alto grading, con margini coinvolti o con infiltrazione tumorale a meno di 1 mm dal margine radiale di resezione. In accordo con le indicazioni emerse nella Consensus Conference, i pazienti con carcinoma del colon in stadio III dovrebbero ricevere un trattamento adiuvante con 5 fluoro-uracile. Studi effettuati hanno evidenziato un vantaggio sia in termini di intervallo libero da malattia (DFS) sia di sopravvivenza (OS), con un aumento del 6% della sopravvivenza a 5 anni. Il trattamento adiuvante andrebbe intrapreso entro 6-8 settimane dalla resezione chirurgica, sebbene vi siano ancora pareri contrastanti sulla modalità di somministrazione, soprattutto in termini di tossicità e compliance. Il protocollo standard prevede

somministrazione di schedule con LV5-FU2 ed Oxiplatino (FOLFOX), oppure un trattamento con 5 fluoro-uracile (5FU) in bolo ed acido folinico (FA) dal giorno 1 al giorno 5 con cicli a 28 giorni secondo i regimi Mayo Clinic, Machover, Roswell Park per 6 mesi. Recenti analisi di vari fattori prognostici suggeriscono che alcuni parametri patologici, grading G3, invasione vascolare e linfatica, ulcerazione, numero di linfonodi asportati/esaminati inferiore a 8 ed alcuni parametri clinici quali perforazione, occlusione intestinale, sono in grado di identificare pazienti ad alto rischio di recidiva in misura simile ai pazienti con linfonodi positivi. Per questi pazienti può essere giustificata la scelta di un trattamento adiuvante con modalità simili a quelle utilizzate per pazienti con linfonodi positivi. Le linee guida NCCN (National Comprehensive Cancer Network) 2006 sono riportate di seguito:

STADIO	TERAPIA ADIUVANTE
Tis, T1N0M0, T2N0M0	follow-up
T3N0M0 (senza fattori prognostici sfavorevoli)	Capecitabina o 5FU+FA+Oxiplatino (FOLOFOX) o trials clinici o follow-up
T3N0M0 (fattori prognostici sfavorevoli per recidiva locale)* T3 (con perforazione localizzata o chiusa o con margini indeterminati o positivi) T4N0M0	Capecitabina o 5FU+FA+Oxiplatino (FOLOFOX) o 5FU+FA o trials clinici o follow-up
T1-3N1-2M0, T4N1-2M0	5FU+FA+Oxiplatino (FOLOFOX) o Capecitabina o 5FU+FA

*Tabella 10: linee-guida NCCN 2006 per il trattamento del cancro del colon. (\* grading G3 e G4, invasione vascolare, occlusione intestinale, meno di 12 linfonodi esaminati)*



## RETTO

Nei casi di cancro del retto le recidive sono frequenti e rappresentano la prima causa di morte, oltre a condizionare pesantemente la qualità di vita del paziente. L'impiego della chemioterapia combinata alla radioterapia post-operatoria rappresenta il trattamento standard negli stadi II e III. L'impiego della sola radioterapia, sebbene in grado di ridurre il tasso di recidive locali, non ha infatti dimostrato un aumento in sopravvivenza, riscontrabile invece negli studi di terapia combinata. La combinazione chemio-radioterapia risulta efficace sia in termini di riduzione delle recidive locali sia in termini di aumento della sopravvivenza. Sempre migliori indicazioni sembrano emergere da studi non-randomizzati (NSABP R-03, German Trial CAO/ARO/AIO-94) su l'impiego di un trattamento combinato pre-operatorio, in cui il ruolo della chemioterapia appare rilevante nell'associazione con la radioterapia per migliorare il downstaging e la conservazione dello sfintere. Numerosi studi (GITSG 7175, NCCTG III, NORWAY TRIAL) evidenziano come l'associazione tra chemioterapia e radioterapia incrementi la sopravvivenza, anche se con un rilevante incremento della tossicità acuta e tardiva sul paziente. In ultima analisi la combinazione 5 FU/ radio (frazioni 180 cGy /5 frazioni a settimana per 5 settimane) risulta il trattamento adiuvante più efficace per i pazienti con cancro del retto stadio II e III.

## TARGET THERAPY

La target therapy, o terapia con farmaci biologici, rappresenta una nuova frontiera nella terapia antitumorale. La ricerca farmacologica e gli studi di farmacogenomica si sono concentrati sulla messa a punto di farmaci mirati in grado di colpire solo alcuni specifici recettori cellulari implicati nello sviluppo e nella crescita neoplastica, senza coinvolgere o danneggiare le cellule sane. Queste molecole presentano alcune caratteristiche comuni:

- azione selettiva e specifica verso le cellule tumorali;
- tossicità significativamente minore rispetto alla chemioterapia tradizionale;
- possibile utilizzo in concomitanza di chemioterapia o radioterapia;
- possibile somministrazione di alcuni farmaci per via orale, con conseguente miglioramento della somministrazione per il paziente e per il personale sanitario.

Il limite nell'utilizzo di questi farmaci è rappresentato dallo spettro d'azione circoscritto a quelle neoplasie nelle quali è stata evidenziata un'alterazione molecolare specifica, tale da poter essere considerata un "bersaglio" della terapia farmacologica.

Queste nuove molecole offrono numerosi vantaggi, tra i quali un tempo di somministrazione più breve, una migliore tollerabilità e l'indipendenza offerta dalla possibilità di autosomministrazione della terapia, fattori che riducono notevolmente l'impatto del trattamento sulla qualità di vita dei pazienti. Tuttavia i farmaci orali presentano anche diverse difficoltà dal punto di vista assistenziale, come la variabilità di assorbimento, la compliance dei pazienti e la necessità da parte di quest'ultimi di valutare e gestire autonomamente gli effetti collaterali.

Attualmente esistono farmaci molecolari (somministrabili per via orale o parenterale) per la terapia del tumore della mammella, del colon-retto, del polmone, del tumore stromale gastrointestinale (GIST), della leucemia mieloide cronica e del linfoma non-Hodgkin. Di seguito vengono riportate tre categorie di terapie biologiche a bersaglio molecolare (tabella 11).

CATEGORIA	BERSAGLIO	FARMACO	SOMMINISTRAZIONE
ANTICORPI MONOCLONALI	contro specifici geni mutati	Trastuzumab (Herceptin)	EV
		Rituximab (Mabthera)	EV
	contro fattori di crescita	Cetuximab (Erbix) EGF	EV
		Bevacizumab (Avastin) VEGF	EV
INIBITORI DI ENZIMI	Tirosin-chinasi	Imatinib (Glivec)	OS
		Erlotinib (Tarceva)	OS
		Gefitinb (Iressa)	OS
		Bortezomib (Velcade)	EV
INIBITORI DI FATTORI DI CRESCITA	VEGF	Sunitinib (Sutent)	OS
		Sorafenib (Nexavar)	OS

*Tabella 11: identificazione delle terapie biologiche a bersaglio molecolare.*

Gli effetti collaterali derivanti dall'uso dei farmaci biologici, seppure presenti, risultano di entità inferiore rispetto a quelli causati dalla chemioterapia standard. Tra i più frequenti:

- eruzioni cutanee su tutto il corpo (Sindrome mano-piede) e discromie;
- prurito;
- febbre, astenia ed emicranie;
- emo-tossicità, soprattutto associata a chemioterapia;
- ipertensione;
- alterazioni endocrine.

Alcune terapie molecolari "mirate" utilizzate per il trattamento delle neoplasia del colon e del retto sono già utilizzate in protocolli standard, tra queste:

- **Anticorpi monoclonali verso il Recettore dell' Epidermal Growth Factor (EGFR).** Il recettore lega una proteina chiamata fattore di crescita epidermico (EGF), ma anche il fattore di crescita trasformante  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ); il legame con il ligando attiva il recettore, che omodimerizza con un altro recettore EGFR oppure eterodimerizza. La omo-eterodimerizzazione porta ad un avvicinamento dei domini citoplasmatici dei recettori; tali domini possiedono un'attività tirosin-chinasica, che innesca la fosforilazione ed il successivo reclutamento di varie proteine in grado di innescare l'attività "pulsatoria" di Ras e quindi, tramite l'attivazione della via delle Map chinasi, la differenziazione e proliferazione cellulare. Il blocco di EGFR produce l'inibizione della trascrizione dei geni implicati nei meccanismi di proliferazione cellulare. L'associazione con farmaci chemioterapici, in particolare Irinotecan, si è dimostrata utile soprattutto nel trattamento dei pazienti già trattati con il solo Irinotecan o in fase avanzata di malattia (Hebbar M et al, 2006). La presenza del recettore, infatti, correla con processi quali l'invasività del tumore, la metastatizzazione e, conseguentemente, una prognosi negativa. La somministrazione di queste molecole ha evidenziato non solo un'attività anti-tumorale diretta contro le neoplasie esprimenti EGFR, ma anche un effetto potenziatore dei trattamenti convenzionali (chemioterapia e radioterapia). In Italia gli inibitori di EGFR sono attualmente inseriti nei trattamenti di seconda e terza linea del tumore del colon retto avanzato, resistente all'irinotecan.
- **Inibitori del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).** VEGF è un importante fattore di crescita, implicato nei processi di proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali. Rappresenta un potente stimolo alla neovascolarizzazione sia nei tessuti sani sia in quelli neoplastici. E' stato osservato che l'iperespressione di VEGF in cellule neoplastiche correla con un fenotipo invasivo, inoltre elevati livelli di VEGF si associano ad un aumentato rischio

di sviluppare metastasi (Gordon S et al, 2001). La somministrazione di anticorpi diretti contro uno dei recettori (anti-VEGFR2) è in grado di ostacolare lo sviluppo della rete di vasi sanguigni che consente al tumore di proliferare e di potenziare l'effetto della chemioterapia. La somministrazione di questi farmaci risulta in genere ben tollerata dal paziente, sebbene possano verificarsi episodi di ipertensione e proteinuria asintomatica, in particolare in pazienti trattati con dosi elevate. Gli inibitori del VEGF sono utilizzati per il trattamento di prima linea del tumore del colon retto avanzato in associazione a chemioterapia con 5-fluorouracile, in associazione o meno a Irinotecan.

## CANCEROGENESI MOLECOLARE

La maggior parte delle neoplasie coloretali si manifesta in forma sporadica e raramente come malattia ereditaria, come descritto precedentemente. Il modello di sviluppo neoplastico più accreditato è quello proposto nel 1990 da Fearon e Volgestein, la sequenza adenoma-carcinoma si basa su alcune importanti osservazioni: - le dimensioni dei polipi, l'istotipo (le lesioni villose mostrano un potenziale maligno maggiore) ed il grado di atipia, che è direttamente proporzionale al potenziale maligno; - la distribuzione degli adenomi si sovrappone a quella dei carcinomi; - il picco d'incidenza dei polipi adenomatosi precede di alcuni anni quello dei carcinomi; - nell'indagine istologica di carcinoma invasivo in uno stadio precoce, si osserva spesso tessuto adenomatoso attorno alla lesione; - il rischio di sviluppare un carcinoma è direttamente proporzionale al numero di adenomi presenti. Va comunque ricordato che alcuni carcinomi si sviluppano senza un apparente precursore adenomatoso.

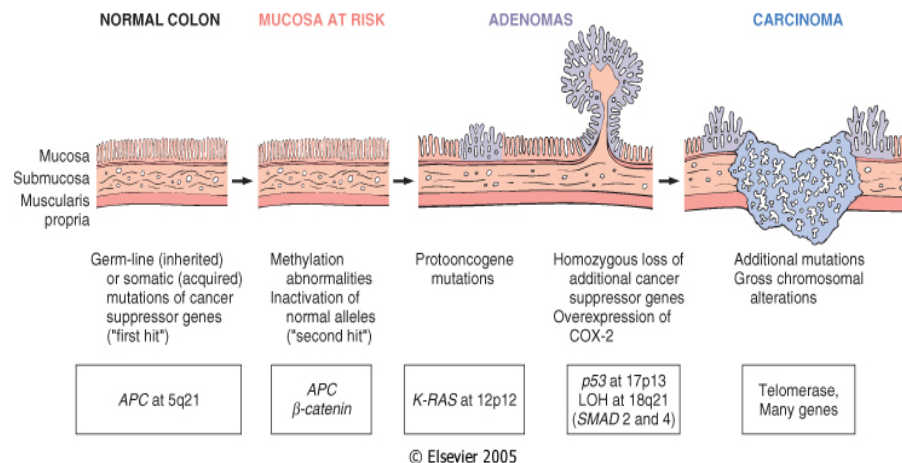


Figura 1: sequenza nella progressione da mucosa sana a carcinoma:

Sono state proposte due vie patogeneticamente diverse per l'acquisizione del fenotipo maligno: la via dell'*apc*/ $\beta$ -catenina, e l'instabilità dei micro satelliti.

*apc*: il gene oncosoppressore è localizzato sul cromosoma 5 in posizione q21-22 e codifica per una proteina citoplasmatica che favorisce la migrazione e l'adesione cellulare. APC regola i livelli di  $\beta$ -catenina, importante mediatore della via Wnt/ $\beta$ -catenina, che a sua volta riveste un ruolo chiave nello sviluppo dell'epitelio intestinale ed è coinvolta nell'insorgenza dei carcinomi coloretali. L'80% delle lesioni carcinomatose mostra un'inattivazione di *apc*, ed il 50% delle neoplasie non mutate per *apc*, mostra comunque mutazioni a carico della  $\beta$ -catenina, componente del complesso di adesione della caderina, agisce come fattore di trascrizione traslocando nel nucleo. In tumori del colon-retto è stata osservata l'espressione di  $\beta$ -catenina sulla membrana e nel citosol correlata ad un'alta espressione di E-caderina, con cui media l'adesione cellulare, mentre in cellule neoplastiche isolate, staccatesi dalla massa originaria,  $\beta$ -catenina è espressa solo a livello nucleare e si perde la molecola di E-caderina sulla membrana (Barker N e Clevers H, 2001). La perdita del gene è alla base della poliposi adenomatosa familiare ed è un chiaro esempio del "concetto del primo colpo" postulato da Knudson nel 1970; infatti la perdita di *apc* è il primo evento nello sviluppo di adenomi.

*Instabilità dei microsatelliti*: mutazioni a carico dei geni riparatori degli errori di allineamento delle molecole di DNA. Il 90% delle mutazioni coinvolge i geni *MSH2*, sul cromosoma 2p22, ed *MLH1*, sul cromosoma 2q31-33, più rare le mutazioni a carico dei geni *hPMS1* e *hPMS2* (Boland CR, 1996). Tali mutazioni provocano alterazioni al livello dei microsatelliti, piccole sequenze di DNA (fino a 6 nucleotidi) altamente ripetute in regioni non codificanti, ma che possono essere localizzate anche in regioni che codificano per geni implicati nella regolazione della crescita cellulare, come ad esempio i geni per il recettore di tipo II per TGF- $\beta$  (citochina regolatrice della crescita cellulare). Mutazioni dei geni MMR sono implicate nel 15% dei carcinomi sporadici e nelle sindromi di Lynch. I pazienti con HNPCC ereditano un allele mutato ("primo colpo" della teoria di Knudson) ed una seconda mutazione somatica

(“secondo colpo”) inattiva l’allele normale, la perdita di eterozigosi (LOH) aumenta di 1000 volte il tasso di mutazioni.

*K-ras*: è localizzato sul 12p12 e codifica per una proteina G monomerica implicata nell’attivazione della via della MAP-chinasi per l’attivazione dei meccanismi di trascrizione e progressione del ciclo cellulare. La mutazione a carico di questo gene è un evento precoce nella progressione adenoma-carcinoma. Secondo alcuni studi *k-ras* è mutato in meno del 10% degli adenomi inferiori ad 1 cm, in circa il 50% delle lesioni adenomatose con dimensioni maggiori di 1 cm (Volgstein B et al., 1988) e in circa la metà degli adenocarcinomi (Bos JL et al., 1987).

*Tp53*: il gene oncosoppressore è localizzato sul cromosoma 17 in posizione p13.1, codifica per un importante fattore di trascrizione implicato nella regolazione del ciclo cellulare. Perdite di *Tp53*, per mutazione o per LOH, sono rare nelle lesioni adenomatose mentre sono state osservate in circa l’80% degli adenocarcinomi coloretali, queste delezioni sono associate alle fasi tardive della cancerogenesi, in particolar modo alla transizione da adenoma fortemente atipico a carcinoma scarsamente invasivo.

*DCC*: nelle neoplasie del colo-retto si osservano spesso delezioni a carico del cromosoma 18q21. Per molto tempo si è ritenuto che il gene oncosoppressore *DCC* (codifica per una proteina implicata nell’adesione cellulare) fosse coinvolto nel fenomeno di patogenesi, recentemente alcuni studi hanno messo in discussione il ruolo di *DCC*, poiché non era emersa alcuna anomalia in topi mutati per entrambi gli alleli (Bader S et al., 2003). Anche mutazioni a carico di *SMAD4*, localizzato sul cromosoma 18q21 e codificante per una proteina implicata nella via segnalatoria di TGF- $\beta$ , sembrano rivestire un ruolo nella cancerogenesi coloretale (Takedo MM et Takaku K, 2000).

*TGF- $\beta$* : codifica per una citochina implicata nella crescita, nella regolazione dell’apoptosi e nella differenziazione delle cellule epiteliali dell’intestino. Il legame tra lo specifico recettore e la citochina regola la trascrizione di numerosi geni coinvolti nella progressione del ciclo



cellulare tra cui *Rb*, la ciclina D1, *cdk4* e gli inibitori delle cicline *p15*, *p21* e *p27*. Nei carcinomi sono frequenti le mutazioni a carico del recettore di tipo II del TGF- $\beta$ .

## FATTORI BIOMOLECOLARI

La cancerogenesi è un processo a più fasi, durante le quali la cellula neoplastica tende ad acquisire una crescente malignità attraverso mutazioni somatiche, che le conferiscono un vantaggio selettivo di crescita. La formazione di nuovi vasi all'interno della massa tumorale garantisce un apporto di nutrienti e di ossigeno senza i quali la crescita si bilancerebbe con il fenomeno di necrosi interno al tumore, inoltre i nuovi vasi costituiscono la principale via di disseminazione metastatica. La capacità di attivare la neoangiogenesi all'interno della lesione è un evento precoce e costituisce un fenomeno chiave nell'acquisizione del fenotipo maligno.

In condizioni fisiologiche l'angiogenesi è un fenomeno finemente regolato da un bilancio tra l'azione di fattori promuoventi (pro-angiogenetici) e fattori inibenti (anti-angiogenetici); durante la normale crescita di un organismo le cellule stimolano i processi di angiogenesi e vasculogenesi (differenziazione di cellule mesodermiche in angioblasti con l'organizzazione di un sistema vascolare non pre-esistente) al fine di aumentare il flusso sanguigno. Diversamente, in condizioni patologiche, come nei tumori, la neoangiogenesi rappresenta una tappa cruciale per la sopravvivenza della cellula in un microambiente caratterizzato da condizione eterogenee di tensione di ossigeno. La formazione di una fitta rete vascolare permette alle cellule un rifornimento di ossigeno e di nutrienti essenziali per la proliferazione, consentendo anche l'eliminazione dei cataboliti cellulari. Nonostante l'attivazione del processo di neoangiogenesi il tasso di proliferazione delle cellule neoplastiche è tale da non permettere un adeguato apporto di ossigeno a

tutta la massa con un conseguente sviluppo di zone ipossiche. Sebbene la maggior parte di queste cellule sia destinata ad essere eliminata attraverso meccanismi di apoptosi, alcuni cloni sono in grado di sopravvivere all'ipossia grazie all'attivazione di *pathways* angiogenetici. Questi cloni possono rimanere silenti per molto tempo prima di acquisire attività angiogenetiche. La formazione dei nuovi vasi parte dalla periferia della lesione e tende ad espandersi, mentre al centro si crea gradualmente una zona ipossica. L'ipossia induce l'espressione di fattori pro-angiogenetici attraverso l'attivazione del fattore inducibile dall'ipossia (HIF1). Il fattore inducibile dall'ipossia è un fattore di trascrizione che media la risposta omeostatica dell'ossigeno e attiva la trascrizione di molti geni tra i quali quelli coinvolti nella risposta angiogenetica, con conseguente attivazione dei meccanismi di sopravvivenza cellulare, di invasività e sviluppo di metastasi.

I modulatori dell'attività angiogenetica sono secreti al livello endoteliale e stromale, tra questi il più importante è il vascular endothelial growth factor (VEGF), in grado di indurre la permeabilità vascolare e di promuovere la proliferazione delle cellule endoteliali. Le condizioni ipossiche stimolano l'attivazione dell'attività trascrizionale di HIF1, il quale a sua volta determina un aumento della trascrizione di *VEGF* e della stabilità del relativo m-RNA. Recentemente è stato dimostrato uno stretto legame tra VEGF e l'attività di un particolare canale voltaggio dipendente per il potassio: hERG1. I canali ionici costituiscono una classe di proteine responsabili della generazione e della modulazione del segnale elettrico a livello cerebrale, cardiaco e muscolare, inoltre rivestono un ruolo importante nella regolazione del meccanismo di proliferazione cellulare. E' stato infatti osservato che l'attivazione di canali ionici di K<sup>+</sup> è un evento fondamentale per il passaggio in fase G<sub>1</sub> sia per le cellule sane sia per le cellule neoplastiche. Il canale hERG1 risulta over-espresso in molte forme tumorali e promuovendo la secrezione di VEGF contribuisce all'acquisizione di un fenotipo maligno. In condizioni di bassa tensione di ossigeno è stata evidenziata una up-regolazione dell'attività del canale

hERG1 che agisce sulla secrezione di VEGF, indotta dall'attivazione di HIF1, modulandone i livelli di mRNA. La specificità dell'effetto angiogenetico esercitato da VEGF è tale da far considerare la proteina come un promettente marcatore molecolare; in aggiunta, la relazione che intercorre tra VEGF ed i canali hERG focalizza l'attenzione degli studi sulla possibilità di utilizzo come markers di progressione tumorale e possibile bersaglio terapeutico.

## VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

L'angiogenesi, formazione dei vasi sanguigni nell'adulto, è un processo essenziale nei casi di infiammazione cronica, fibrosi, nella vascolarizzazione di tessuti ischemici, ma anche nella crescita neoplastica, dove questo fenomeno assicura apporto di O<sub>2</sub> e fattori di crescita in modo che la lesione possa crescere ed infiltrare tessuti ed organi adiacenti (Folkman J Shing Y 1992). Acquisita la capacità angiogenetica le cellule tumorali sono in grado di indurre alterazioni fenotipiche sulle cellule dell'endotelio (Norrby K 1997), che proliferano e costituiscono una nuova rete vascolare, con cui la massa neoplastica incrementa le proprie dimensioni acquisendo capacità invasive e potenziale metastatico.

Il più importante fattore nel processo angiogenetico è VEGF, potente mitogeno per cellule endoteliali di vene, arterie e capillari. Tra i fattori angiogenetici quali TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , VEGF è l'unico che si rileva in ogni sede di angiogenesi ed le cui concentrazioni siano strettamente correlate ai meccanismi propri dello sviluppo vascolare.

Il gene *VEGF* è localizzato sul cromosoma 6 in posizione p21.3 (Vincenti V et al., 1996), è composto da 8 esoni alternati a 7 introni ed una regione codificante di circa 14kb. Come mostrato in figura 4 si originano diverse molecole, per splicing alternativo di un solo singolo pre-mRNA (Tischer E et al., 1991)

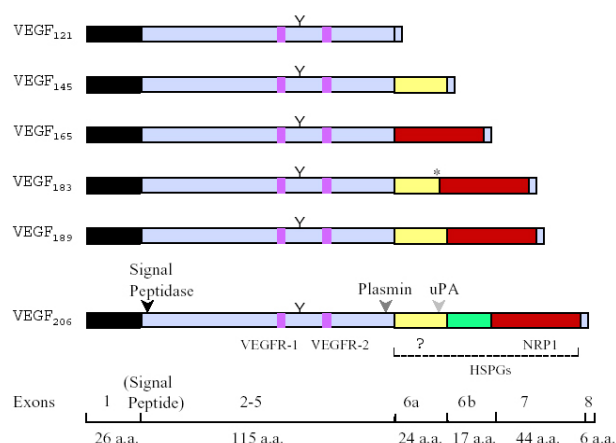


Figura 2: splicing alternativo di un pre-mRNA da cui si originano molecole di 121, 145, 165, 183, 189, 206 aminoacidi di VEGF.

Le varie isoforme differiscono per la presenza/assenza delle sequenze codificate dagli esoni 6 e 7.

- isoforma VEGF<sub>121</sub>, il cui trascritto si ritrova nella maggioranza delle cellule esprimenti VEGF, manca dei residui codificati dagli esoni 6 e 7, codifica per una proteina debolmente acida secreta nello spazio extracellulare, che non lega l'eparina;
  - isoforma VEGF<sub>145</sub>, manca dei residui codificati dagli esoni 6 e 7, ha una alta affinità per l'eparina;
  - isoforma VEGF<sub>165</sub>, priva di residui codificati dall'esone 6, è predominante e risulta secreta da molti citotipi sia normali sia trasformati;
  - isoforma VEGF<sub>189</sub>, presenta un'inserzione di 24 aminoacidi, contiene sequenze codificate dall'esone 6 con cui è in grado di legarsi fortemente all'eparina ed è per questo sequestrata nella matrice. Si ritrova nella maggioranza delle cellule esprimenti VEGF;
  - isoforma VEGF<sub>206</sub>, presenta un'inserzione di 41 aminoacidi, come l'isoforma VEGF<sub>189</sub>, presenta sequenze che permettono forte affinità con l'eparina ed il sequestro nella matrice. E' un isoforma estremamente rara.
- (Houck KA et al., 1991)

La tensione d'ossigeno svolge il ruolo principale nella regolazione genica di VEGF ed alcuni esperimenti hanno dimostrato che in masse tumorali con vaste zone di necrosi, le cellule ischemiche, circostanti le aree necrotiche, mostravano alti livelli di mRNA di VEGF (Shweiki D et la.,

1992), evidenziando come le condizioni ipossiche del micro-ambiente tumorale possano indurre l'attivazione di *VEGF*. Un'ulteriore conferma si è ottenuta analizzando il 5' del promotore di *VEGF*, a livello del quale è stata identificata una sequenza di 28pb che mostra stretta omologia e caratteristiche simili al sito di legame per HIF1 (Hypoxia Inducible Factor) sul gene dell'eritropoietina (Madan A Curtin PT, 1993). L'espressione di *VEGF* è regolata dall'azione di molte citochine (IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 e PGE2) e fattori di trascrizione come EGF e TGF $\beta$ . A livello post-trascrizionale, l'espressione viene regolata attraverso l'aumento della stabilità del mRNA, determinata da specifiche sequenze nella regione non tradotta al 3' del gene. Altri fattori possono indurre l'espressione di *VEGF*, tra i quali vari fattori di crescita, interleuchine, proteine regolatrici del ciclo cellulare e proteine codificate da oncogeni.

*VEGF* è il più importante fattore di crescita implicato nel fenomeno di angiogenesi (si veda tabella 11). In condizione fisiologiche *VEGF* induce proliferazione cellulare e migrazione delle cellule endoteliali (danno tissutale provocato da ferite o traumi) nonché attività pro-angiogenetiche come l'attivazione dell'espressione di proteasi e collagenasi e gli attivatori del plasminogeno (le cellule si distaccano dalla matrice e migrano, Pepper MS et al., 1991). Inoltre è in grado di incrementare la permeabilità vascolare (Senger DR et al., 1983) caratteristica a cui deve il suo secondo nome Vascular Permeability Factor (VPF).

ISOFORME	RECETTORI	FUNZIONI
VEGF-A	VEGFR-1, VEGFR-2, Neuropilina1	angiogenesi, integrità vascolare
VEGF-B	VEGFR-1	non conosciuta
VEGF-C	VEGFR-2, VEGFR-3	linfoangiogenesi
VEGF-D	VEGFR-2, VEGFR-3	linfoangiogenesi
VEGF-E	VEGFR-2	angiogenesi
PlGF	VEGFR-1, Neuropilina-1	angiogenesi, flogosi

Tabella 12: isoforme di *VEGF*, recettori e funzioni associate.

Il meccanismo di attivazione è mediato dal legame con il recettore specifico, localizzato al livello della membrana della cellula bersaglio.

La struttura dei recettori per VEGF è composta di 7 domini IG-like, il secondo ed il terzo dei quali sembrano essere essenziali per il legame recettore-ligando ad alta affinità. Esistono due tipi di recettori: VEGFR di tipo I, VEGFR-1 o Flt-1 (*fms*-like tyrosine-kinase), è una glicoproteina di 180 kDa con alta affinità per il ligando (Shibuya M et al., 1990), svolge un ruolo fondamentale nella vasculogenesi, l'm-RNA corrispondente si trova sia in cellule quiescenti sia in cellule endoteliali proliferative ed è implicato nel mantenimento della struttura endoteliale. VEGFR di tipo II, VEGFR-2 o KDR (kinase domain region), è una proteina di 200 kDa circa, mostra alta omologia con Flk1 espressa in precursori ematopoietici, in cellule endoteliali e in cellule stromali del cordone ombelicale (Matthews W et al., 1991). Il legame ligando-recettore KDR trasduce un segnale mitogenico e chemiotattico.

In VEGFR-1 il secondo dominio riveste il ruolo più importante per il legame con il ligando, mentre in VEGFR-2 questa caratteristica è propria del terzo dominio Ig-like. Il quarto dominio di entrambi i recettori, media la dimerizzazione dopo il legame con il ligando, mentre per il recettore di tipo II il primo dominio sembra essere deputato alla regolazione del legame di VEGF, dato che la rimozione ne aumenta l'associazione (Robinson CJ, Stringer SE, 2001).

Entrambi i recettori, una volta attivati dal ligando, innescano diversi tipi di risposte:

- VEGFR-1 favorisce la migrazione dei monociti (Barleon B et al., 1996);
- VEGFR-2 è implicato nelle risposte cellulari al livello endoteliale.

Alcuni studi hanno dimostrato che il segnale mediato da VEGF risulta nella fosforilazione di varie proteine, tra cui la fosfolipasi  $C\gamma$  e PI3 chinasi. Il recettore KDR, una volta legato al ligando specifico, va incontro a fosforilazione tirosinica, diversamente da Flt1. Cellule NIH-3T3, transfettate con VEGFR-1, stimulate con VEGF mostrano una debole fosforilazione tirosinica, senza alcun segnale mitogenico (Seetharam L et

al., 1995), questo dato fa presumere che il recettore svolga un ruolo come “regolatore negativo” dell’attività di VEGF, sequestrando il legando e rendendolo meno disponibile per KDR (Park JE et al., 1994), dati successivi hanno dimostrato che il Flt1 è in grado di interagire con proteine implicate nei meccanismi segnalatori della cellula (Ferrara N, 1999).

Nel corso degli anni numerosi studi hanno dimostrato che l’RNA messaggero di VEGF è regolato positivamente in vari tipi di tumori tra cui tiroide, mammella, polmone, tratto gastro-intestinale, rene, cervice e neoplasie intracraniche (Ferrara N, 1996a). Esperimenti condotti con tecniche di immunoistochimica e ibridazione *in situ* hanno dimostrato la presenza di alti livelli di VEGF e del trascritto corrispondente in cellule di adenocarcinoma del colon, contrariamente a quanto osservato nell’epitelio sano, in polipi iperplastici ed adenomi. Successivamente analisi di RT-PCR quantitativa hanno fornito dati contrastanti, evidenziando comunque l’up-regolazione di VEGF in adenomi rispetto al controllo sano ed un successivo incremento nelle lesioni progressivamente più invasive (Wong MP et al., 1999).

E’ stato dimostrato, tramite analisi di Northern Blot, che i livelli di RNA messaggero di VEGF sono confrontabili sia in adenocarcinomi senza interessamento linfonodale sia in lesioni con linfonodi positivi e metastasi: sulla base di questi risultati si ritiene che l’espressione di VEGF sia un evento precoce nel processo di cancerogenesi coloretale (Andrè T et al., 2000). Alcuni studi hanno posto l’attenzione sulla possibile correlazione tra i livelli sierici di VEGF, espressione intratumorale del fattore ed outcome; in pazienti affetti da carcinoma del colon-retto i livelli ematici di VEGF sono elevati, ma tendono ad aumentare ancora di più in pazienti con malattia metastatica (Kumar H et al., 1998). Negli stadi avanzati della malattia l’espressione intratumorale di VEGF è associata a ridotti OS e DFS, nonché ad un aumentato rischio di morte.

VEGF sembra svolgere un ruolo di primo piano nell’acquisizione di un fenotipo maligno e può essere considerato un promettente fattore

prognostico (Minato E et al., 2002). Studi effettuati, su una casistica di adenocarcinomi coloretali, hanno indicato una correlazione tra l'espressione di HIF1 $\alpha$  e di VEGF negli stadi avanzati della malattia (Dao C et al., 2009), in relazione con un decorso più aggressivo ed una prognosi peggiore. L'inibizione di HIF1 $\alpha$  potrebbe risultare un promettente bersaglio di terapia angiogenetica, anche in correlazione con VEGF.

## MARKERS DI IPOSSIA

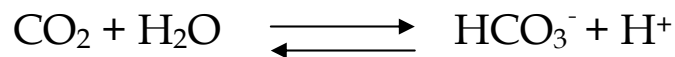
Una delle cause più comuni di scarsa efficacia del trattamento chemioterapico è l'ipossia, tanto da essere considerata un importante fattore predittivo negativo di risposta alla chemioterapia. Studi clinici e pre-clinici hanno dimostrato come l'ipossia comprometta la risposta al trattamento limitando la diffusione del farmaco e rallentando la progressione del ciclo cellulare, inoltre dopo il solo intervento chirurgico si associa ad un peggior outcome (Brown JM et al., 1999). Condizioni ipossiche agiscono sulla massa tumorale selezionando le cellule con fenotipo glicolitico e quelle con mutazioni a carico di oncogeni che ne favoriscono la sopravvivenza. La presenza di ipossia può essere rilevata con metodiche di immunoistochimica e l'utilizzo di markers endogeni, con il vantaggio di fornire informazioni sulla distribuzione spaziale delle zone ipossiche e di poter analizzare anche campioni provenienti da tessuti o organi in cui non è possibile l'utilizzo di elettrodi ad ossigeno. I markers endogeni sono molecole prodotte da geni attivati dall'ipossia come ad esempio HIF-1, un fattore stabilizzato in condizioni di bassa tensione di ossigeno, responsabile non solo delle alterazioni di espressione genica, ma contribuisce anche alla progressione tumorale ed allo sviluppo di un fenotipo non responsivo alla terapia (Harris AL, 2001). Inoltre HIF1 $\alpha$  incrementa l'angiogenesi mediante l'attivazione di VEGF (Forsythe JA et al., 1996), effetto ipossia-indipendente in alcune forme neoplastiche (Semenza GL, 2003).



Altri indicatori endogeni di bassa tensione di ossigeno sono l'anidrasi carbonica (CAIX), microvessel density (MVD), epidermal growth factor receptor (EGFR) e Glut1 (trasportare di glucosio), tra questi CAIX è la più studiata.

#### ANIDRASI CARBONICA IX

Le anidrase carboniche sono enzimi che catalizzano la reazione di idratazione reversibile della CO<sub>2</sub> in acido carbonico



Le anidrase carboniche sono fondamentali per il mantenimento del valore fisiologico di pH a livello cellulare, nonché della concentrazione di H<sub>2</sub>O e dell'equilibrio ionico nell'organismo. Suddivise in tre classi  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , sono prive di omologia di sequenza ed hanno origini indipendenti (Tripp BC et al., 2001). Sono stati identificati 14 isoenzimi appartenenti alla classe  $\alpha$  e espressi in diversi tessuti umani. Le varie forme di anidrase hanno localizzazione cellulare e proprietà cinetiche differenti:

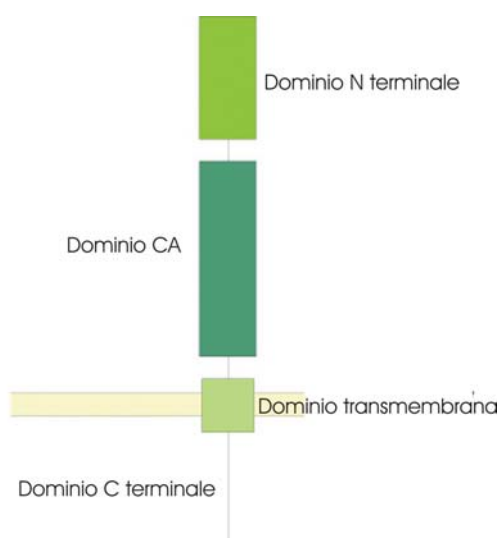
- CA I, II, III e VII sono enzimi citoplasmatici;
- CA IV è ancorata alla membrana cellulare;
- CA V è un enzima mitocondriale;
- CA VI è una proteina secreta;
- CA IX, XII, XIV sono proteine integrali di membrana.

L'anidrasi carbonica IX è l'isoenzima più studiato in campo oncologico, poiché la sua espressione correla con la cancerogenesi in diversi distretti dell'organismo, ed è considerato un antigene tumore-associato.

CAIX è una proteina integrale di membrana, come mostrato in figura 5, identificata per la prima volta in cellule HeLa (Pastorekova S et al., 1992), dove l'espressione di CAIX è dipendente dalla densità cellulare ed

associata al fenotipo tumorigenico in ibridi HeLa-fibroblasti ed al fenotipo neoplastico in cellule NIH3T3 transfettate con il gene CA9 (Pastorek J et al., 1994). La proteina, al livello nucleare e della membrana plasmatica, è stata evidenziata in linee cellulari e neoplasie primarie, ma non nei tessuti sani corrispondenti (Pastorekova S et al., 1992), inoltre è espressa in alcuni tessuti sani quali la mucosa gastrica (Pastorekova S et al., 1997) e colica (Saarnio J et al., 1998). Tramite esperimenti di Western Blot è stata osservata la presenza di due bande rispettivamente del peso di 54 e 58 kDa, che derivano probabilmente dal processamento post-traduzionale di un singolo prodotto genico (Pastorekova S et al., 1994).

Le porzioni carbossi-terminale e centrale risultano altamente conservate. E' stata evidenziata anche una debole attività carbonica anidrasica ed una forte affinità di legame per gli ioni  $Zn^{2+}$  come le altre forme enzimaticamente attive (Pastorekova S et al., 1994). Il dominio centrale, con attività enzimatica, e la porzione amino-terminale sono indispensabili per il legame con il DNA.



*Figura 3: struttura di CAIX.*

Il gene CA9 è localizzato sul cromosoma 9 in posizione p12-13, è composto da 11 esoni, con 10.9kb di cui 3.5kb che costituiscono la sequenza a monte del 5'. Per la peculiarità dei domini amino- e carbossi-terminale CA9 è

considerato un gene chimerico, assemblato attraverso un meccanismo di exon-shuffling (Opavsky R et al., 1996). L'analisi funzionale della regione a monte del 5' ha condotto all'identificazione del promotore di CA9 nella regione -173; +31 (Kaluz S et al., 1999).

Fibroblasti transfettati con CA9 vanno incontro ad alterazioni morfologiche e crescita incontrollata, questo dato ha indotto i ricercatori a considerare CAIX un fattore determinante nel fenomeno di progressione neoplastica (Pastorek J et al., 1994). Uno studio più recente, condotto su linee cellulari di diversa origine e su varie neoplasie umane ha suggerito che l'espressione di CAIX costituisca un requisito importante per il mantenimento del pH a valori acidi favorenti la crescita tumorale e la capacità metastatizzante (Ivanov S et al., 2001). Studi più recenti, condotti *in vitro* ed *in vivo* hanno ulteriormente confermato che CAIX e CAXII promuovono la crescita neoplastica mediante una fine regolazione dei valori di pH cellulare (Chiche J et al., 2009).

Tecniche di immunoistochimica hanno evidenziato la presenza di CAIX in tumori coloretali (Saarnio J et al., 1998a), renali (Murakami Y et al., 1999), pancreatici (Kivelä AJ et al., 2000). La stessa tecnica applicata su sezioni di mucosa sana del colon-retto ha mostrato una moderata espressione di CAIX nel cieco e nel colon ascendente, un'espressione debole nel trasverso e nel discendente, che tende a scomparire nel sigma e nel retto (Saarnio J et al., 1998a). CAIX è presente sulla superficie basolaterale degli enterociti del duodeno e del digiuno, soprattutto al livello delle cripte (Saarnio J et al., 1998a), dove la maggiore espressione suggerisce un ruolo nei meccanismi proliferativi degli enterociti. Gli stessi Autori hanno confermato la co-presenza di CAIX e Ki-67 in cellule adenomatose, ben evidente a livello delle cripte. Adenomi e carcinomi coloretali mostrano un alto livello di espressione di CAIX, rispetto alla mucosa normale ed a lesioni iperplastiche (Kivelä AJ et al., 2001), per contro è stato ipotizzato che in tumori derivanti da tessuti con elevata espressione di CAIX sia presente una down-regolazione di CA9 (Pastorekova S et al., 1997). Un'eccezione a questa ipotesi è rappresentata dai tumori biliari, infatti

CAIX è espressa nella mucosa biliare ed assente negli epatociti e lo stesso andamento si osserva nelle lesioni neoplastiche corrispondenti, con una alta percentuale di tumori biliari CAIX positivi contro una percentuale inferiore negli epatocarcinomi (Saarnio J et al., 2001). Le isoforme CAIX e CAXII sono espresse nelle strutture acinari e duttali del pancreas, non nella componente esocrina (Kivelä AJ et al., 2000); come osservato nell'epitelio intestinale CAIX è localizzata al livello della membrana basolaterale e si osserva un aumento dell'espressione nei vari stadi di progressione neoplastica dalla mucosa sana, all'iperplasia, alla displasia sino alla lesione tumorale.

Nel 1999 Murakami e collaboratori dimostrarono la maggior espressione di CAIX nei carcinomi renali rispetto agli oncocitomi ed al tessuto sano, associandosi ad una prognosi migliore. Studi condotti su linee cellulari di carcinoma renale hanno evidenziato una variabilità di espressione di CAIX (Ashida S et al., 2002), che risulta regolata dalla forma wild-type del gene *vhl* (Von Hippel-Lindau) (Ivanov SV et al., 1998).

Sono stati analizzati anche adenocarcinomi della mammella, quasi il 50% dei campioni analizzati da Chia (Chia SK et al., 2001) risultavano esprimenti CAIX e mostravano una correlazione statisticamente significativa con la presenza di aree di necrosi, grado di differenziazione ed assenza di recettori per gli estrogeni. La presenza di questa proteina correla con una scarsa sopravvivenza ed ne è stato proposto l'utilizzo come fattore prognostico indipendente. Una correlazione statisticamente significativa è stata individuata anche nei carcinomi polmonari a piccole cellule dove l'espressione di CAIX correla con aree necrotiche (Giatromanolaki A et al., 2001), ed alcuni parametri clinico-patologici nonché con la sopravvivenza.

CAIX viene utilizzato come marcatore di cellule ipossiche nei carcinomi della cervice uterina (Loncaster JA et al., 2001), in queste neoplasie CAIX risulta overespressa ed associata ad una prognosi sfavorevole, gli stessi Autori ne propongono l'utilizzo come criterio aggiuntivo per la selezione dei pazienti da indirizzare verso un trattamento radiante. Recentemente è

stato dimostrato da Sansone e collaboratori (Sansone P et al., 2008) che CAIX e COX<sub>2</sub>, i cui livelli aumentano in condizioni ipossiche, sono in grado di promuovere un comportamento più aggressivo nelle neoplasie coloretali. Nelle cellule del colon-retto PGE<sub>2</sub>, prodotto dal gene COX<sub>2</sub>, promuove l'espressione genica di CAIX attraverso l'attivazione di ERK1/2. In condizioni di ipossia i livelli di COX<sub>2</sub> e CAIX aumentano, così l'interazione incrementa il potenziale invasivo delle cellule neoplastiche promuovendo un comportamento più aggressivo. In campioni primari l'espressione di queste proteine favorisce la progressione della malattia a stadi più aggressivi e con prognosi peggiore. Gli Autori suggeriscono che la down-regolazione farmacologica dell'interazione COX2-CAIX possa rappresentare una strategia terapeutica per contrastare le forme più aggressive della malattia.

#### TRASPORTATORE DI GLUCOSIO

Il passaggio di glucosio attraverso la membrana citoplasmatica può avvenire:

- secondo gradiente di concentrazione, il glucosio una volta all'interno, viene utilizzato dal metabolismo cellulare;
- contro gradiente di concentrazione ad esempio processo di assorbimento ad opera delle cellule epiteliali dell'intestino e del rene.

Il flusso di molecole di glucosio è fisiologicamente diretto all'interno della cellula, dove viene rapidamente metabolizzato, mentre all'esterno la concentrazione rimane intorno a valori di 5 mM (Paoletti R et al., 2004).

I trasportatori di glucosio sono caratterizzati da 12 domini trans-membranari, entrambe le estremità carbossi- ed amino-terminale sono intra-citoplasmatiche e presentano una catena oligosaccaridica extracellulare. Le differenze tra le isoforme sono a carico di specificità di substrato, distribuzione tissutale (come mostrato in tabella 13) e proprietà cinetiche.

ISOFORME Glut	DISTRIBUZIONE TISSUTALE
Glut-1	Sistema Nervoso Centrale (microcircolo), eritrociti
Glut-2	$\beta$ -cellule pancreatiche, fegato
Glut-3	Sistema Nervoso Centrale (neuroni)
Glut-4	muscolo, tessuto adiposo, miocardio
Glut-5	intestino, rene, testicolo,
Glut-6	Sistema Nervoso Centrale, leucociti
Glut-7	ignota
Glut-8	Sistema Nervoso Centrale, testicolo
Glut-9	fegato, rene, placenta, leucociti
Glut-10	fegato, pancreas
Glut-11	muscolo, miocardio
Glut-12	prostata, miocardio, placenta, ghiandola mammaria
HMIT	Sistema Nervoso Centrale

Tabella 13: isoforme e localizzazione tissutale dei trasportatori di glucosio.

Un maggior consumo di glucosio, soprattutto a causa del metabolismo glicolitico anaerobio, è proprio delle cellule con fenotipo maligno (Warburg O, 1956). Nella cellula neoplastica l'aumentato uptake è mediato dall'incremento dell'espressione dei trasportatori situati sulla membrana cellulare.

GLUT-1, sequenziato per la prima volta in cellule di epatoma umano (Shows T et al., 1987), è espresso ad alti livelli negli eritrociti e nelle cellule endoteliali del cervello. GLUT-1 è localizzato sul cromosoma 1 in posizione p35-31.3 (Fukumoto H et al., 1988). E' espresso a vari livelli in molti tessuti ed è il maggior responsabile dell'uptake del glucosio a livello cellulare (Birnbbaum MJ et al., 1986). Nel microambiente tumorale le condizioni ipossiche determinano un aumento nella trascrizione di *Glut-1*, mediata dall'azione di HIF-1 (Behrooz A, et al., 1997).

Diversi studi hanno dimostrato che *Glut-1* risulta overespresso in vari tipi di tumore come nei carcinomi gastro-intestinali (Yamamoto T et al., 1990),

nei carcinomi mammari (Brown RS Wahl RL, 1993), nei carcinomi a cellule squamose del distretto testa-collo (Mellan P et al., 1994), nei carcinomi renali (Nagase Y et al., 1995) ed negli epatocarcinomi (Su TS et al., 1990). E' documentata una associazione tra l'espressione di *Glut-1* e una prognosi peggiore. Questo dato trova ulteriore conferma in un recente studio (Chung FY et al., 2009), nel quale, in pazienti con malattia neoplastica coloretale in stadio II e III, è stata dimostrata sia una over-espressione di Glut1, HIF1 $\alpha$  e HIF2 $\alpha$  sia un incremento di mRNA di Glut1 nel sangue periferico. Gli Autori suggeriscono l'utilizzo di Glut1 come un marcatore stadio-associato utilizzabile con metodiche diagnostiche non invasive quali FDG-PET (Fluoro Deoxy Glucose- Positron Emission Tomography) per identificare i pazienti con malattie maggiormente responsive ai trattamenti radio-chemioterapici.

Alcuni studi hanno quantificato il livello di ipossia intratumorale in lesioni neoplastiche della cervice uterina, con l'utilizzo di elettrodi Eppendorf e Pimonidazole, evidenziando una correlazione tra l'espressione di Glut-1 e alti livelli di ipossia (Airley R et al., 2001). Anche in questo caso i livelli di espressione di Glut-1 possono costituire un marker endogeno di ipossia di facile utilizzo. Altre isoforme di trasportatori di membrana risultano iperespressi in diverse forme tumorali, sebbene ancora oggi il loro ruolo non sia stato ancora definito: nel tumore gastrico è stata evidenziata la presenza di tutte le isoforme (Noguchi Y et al., 1999), nei tumori della regione testa-collo (Mellan P et al., 1994) e nei tumori del polmone non a piccole cellule (Younes M et al., 1997) solo Glut-1 e Glut-3; nel carcinoma mammario le forme Glut-1, Glut-3; Glut-4 (Brown RS Wahl RL, 1993).

Ulteriori esperimenti, anche per i carcinomi coloretali, hanno confermato che l'aumento di espressione di *Glut-1* e la corrispondente proteina rivestono un ruolo importante nell'acquisizione del fenotipo maligno, poiché il trasportatore non risulta presente nella mucosa colica sana, mentre è rintracciabile in circa il 90% dei campioni di carcinoma del colon-retto (Haber RS et al., 1998). Inoltre quando presente ad alti livelli, la

proteina correla con l'entità dell'interessamento linfonodale e l'insorgenza di metastasi. Sempre in questo lavoro l'analisi dei dati sulla sopravvivenza ha evidenziato che la mortalità è significativamente più alta nei pazienti con elevata espressione di Glut-1, tanto che gli Autori ne suggeriscono un ruolo come marcatore prognostico indipendente negativo nel carcinoma del colon-retto. Altri dati sembrano confermare l'interazione tra l'espressione di Glut1 ed un andamento più aggressivo della malattia, sebbene un recente studio (Cleven AHG et al., 2007) sul possibile ruolo di proteine ipossia-dipendenti, come fattori prognostici negativi, in pazienti affetti da adenocarcinoma del colon-retto, abbia messo in evidenza una correlazione tra l'espressione epiteliale del trasportatore di glucosio ed una prognosi migliore. Tuttavia non vi sono ancora evidenze univoche, che correlino statisticamente l'espressione del trasportatore a parametri di sopravvivenza.

## I CANALI IONICI

I canali ionici sono costituiti da una classe di proteine responsabili della generazione e della modulazione di segnali elettrici fondamentali per il funzionamento delle cellule eccitabili del cervello, del cuore e del muscolo. Sono state identificate varie patologie associate al mancato e/o anomalo funzionamento dei canali (canalopatie), di seguito ne vengono citate alcune:

- fibrosi cistica, il gene *CFTR* codifica per un canale del cloro espresso a livello epiteliale;
- ipoglicemia iperinsulinica persistente familiare infantile, il gene *SUR1* codifica per un canale del potassio espresso a livello pancreatico;
- malattia di Dent, il gene *CLCN5* codifica per un canale del cloro espresso a livello renale;
- malattia di Liddle, il gene *EnaC* codifica per un canale del sodio espresso a livello epiteliale;



- miotonia generalizzata di Becker e miotonia congenita di Thomsen, il gene *CLCN1* codifica per un canale del cloro espresso a livello muscolare;
- sindrome QT-lungo (tipo 1,2,3,4,5), vari geni codificano per canali del sodio e del potassio espressi a livello cardiaco.

In particolare la sindrome del QT lungo (LQT) provoca aritmie cardiache tipiche e morte improvvisa in bambini e giovani adulti. Esistono una forma ereditaria, rara, a trasmissione autosomica dominante ed una forma acquisita, più comune, in cui l'ipokalemia e la somministrazione di farmaci antiaritmici, come il sotalolo, contribuiscono in maniera evidente (Rosen DM, 1988). La sindrome del QT lungo, sia la forma ereditaria sia la forma acquisita, è caratterizzata da una particolare aritmia "torsade de pointes", una tachicardia polimorfica ventricolare associata ad un'anomala ripolarizzazione cardiaca, osservabile in un elettrocardiogramma come un prolungamento dell'intervallo QT, che può degenerare in una fibrillazione ventricolare e portare a morte improvvisa.

Alterazioni nei geni *KvLQT1*, *herg*, *KCNE1*, codificanti per subunità di canali del potassio, sono responsabili di tre forme di LQT, in particolare mutazioni a carico di *herg* sono state individuate in pazienti affetti da LQT di tipo 2 (Curran ME et al., 1995 e Sanguinetti MC et al., 1995).

Sebbene inizialmente lo studio del ruolo dei canali ionici fosse focalizzato su patologie cardiache e del Sistema Nervoso Centrale, successivamente l'interesse si è spostato anche sul ruolo esercitato dai canali del potassio nel controllo della proliferazione cellulare (DeCoursey TE et al, 1984). Nel 1986 Binggeli e Weinstein (Binggeli R Weinstein R, 1986) suggerirono che un'alterazione del potenziale di riposo delle cellule tumorali potesse favorire la proliferazione cellulare. Successivamente è stato dimostrato come l'espressione di alcuni oncogeni influenzi l'attività dei canali ionici del  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^+$  e che geni codificanti per canali  $\text{K}^+$ -voltaggio dipendenti mostrino un potenziale oncogenico (Pardo LA et al., 1999), mentre alcuni geni codificanti per canali ionici sono stati definiti come immunosoppressori in neoplasie umane. Nelle cellule neoplastiche il pattern di espressione dei canali risulta spesso mutato, infatti molti canali

del potassio e del sodio sono iperespressi ed in particolare si osserva un'alterata localizzazione cellulare dei canali  $K^+$  inward, dimostrata nelle cellule di astrocitomi (Masi A et al., 2005). L'attività del canale di potassio è implicata non solo nella regolazione della proliferazione cellulare, ma anche nel controllo dell'apoptosi (Yu SP, 2003), infatti la diminuzione del volume cellulare, dovuta alla fuoriuscita di ioni potassio, è uno dei primi segnali di una cellula in apoptosi.

Il ruolo dei canali ionici nella regolazione dell'invasività e dell'angiogenesi non è ancora stato completamente definito, sebbene alcuni studi (Davis MJ et al., 2002) ne documentino il ruolo nel rimodellamento del citoscheletro e nell'interazione cellulare, che rappresentano le fasi iniziali verso l'incremento della motilità, requisito fondamentale nell'invasione neoplastica. In generale, i canali del potassio risultano frequentemente overespressi negli stadi precoci della progressione neoplastica a causa del ruolo svolto dai canali nel fenomeno di proliferazione cellulare. Negli stadi tardivi della malattia neoplastica si osserva una maggiore variabilità a causa della risposta cellulare a differenti stimoli fisiologici. In particolare nel carcinoma del colon-retto, i canali di potassio voltaggio-dipendenti controllano la proliferazione cellulare mediante regolazione intracellulare del pH, delle vie di segnalazione intracellulari  $Ca^{2+}$ -mediate. Negli stadi tardivi della malattia l'interazione dei canali del potassio con la  $\beta 1$ -integrina modula la capacità invasiva (Arcangeli A, Becchetti A, 2006). Il controllo della motilità cellulare deriva probabilmente dall'interazione di diversi canali del potassio (Lotz M et al., 2004).

## IL CANALE hERG

I canali hERG sono responsabili della corrente di potassio coinvolta nella fase di ripolarizzazione che segue il potenziale d'azione a livello cardiaco, sembra infatti che i canali hERG svolgano un ruolo di "soppressione" della depolarizzazione che provoca un firing precoce. I pazienti affetti da LQT2, infatti, a causa delle mutazioni di *herg*, non hanno meccanismi di

difesa nei confronti dell'evento aritmico e possono andare facilmente incontro a morte improvvisa (Ackerman MJ, Claphman DE, 1997).

Il gene *herg* è localizzato sul cromosoma 7 in posizione q35-36 (Warmke JW Ganetzky B, 1994) ed è stato clonato da una libreria di cDNA di ippocampo umano. E' composto da 1159 aminoacidi ed entrambe le estremità sono intra-citoplasmatiche.

Il dominio N-terminale è tipico della famiglia dei canali EAG, cui hERG appartiene. I canali EAG si caratterizzano per la chiusura ad alte concentrazioni di  $Ca^{2+}$  ed un ritardo nell'attivazione in presenza di un potenziale di riposo molto negativo.

L'analisi cristallografica della struttura di hERG ha evidenziato un dominio PAS - Per Arnt Sim (Morais Cabral JH et al., 1998), a lato del quale si trova un dominio specifico per hERG, dominio prossimale, che si estende dall'aminoacido 135 al 366 circa (Warmke JW Ganetzky B, 1994).

hERG ha la caratteristica struttura dei canali  $K^{+}$ -voltaggio dipendenti: composto da quattro subunità, ciascuna a sua volta formata da sei segmenti trans-membranari (S1-S6), che si assemblano a formare un tetramero che racchiude un poro acquoso centrale (figura 2). I segmenti S1-S6 hanno struttura  $\alpha$ -elica idrofobica, mentre S4 contiene aminoacidi a carica positiva (Lys e Arg) e si comporta come un sensore del voltaggio. La regione del poro è altamente conservata, contrariamente alle porzioni amino e carbossi-terminale.

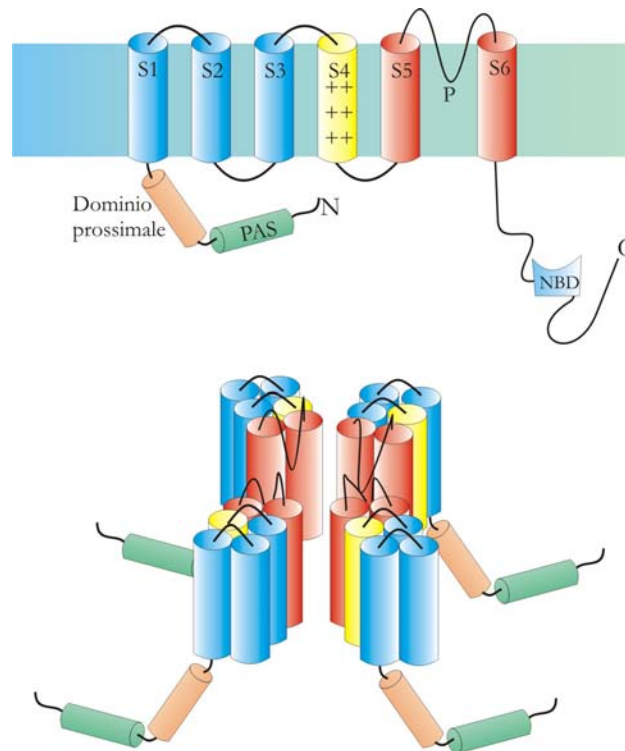


Figura 4: struttura del canale hERG.

I canali della sottofamiglia *erg* sono caratterizzati da un processo di inattivazione molto più rapido di quello di attivazione, ciò comporta una conduzione di correnti in uscita molto ridotte a potenziali depolarizzati. (Paoletti R. et al., 2004). Tale rapida inattivazione determina una corrente in entrata. I canali definiti rettificatori variano la loro conduttanza al variare del potenziale. In particolare i canali “*outward rectifier*” conducono corrente verso l'esterno, in seguito alla depolarizzazione di membrana che rende l'interno più positivo, i canali “*inward rectifier*”, viceversa, conducono corrente verso l'interno della cellula in seguito a ripolarizzazione.

Il flusso di ioni attraverso la membrana dipende da due fattori: il *gradiente elettrochimico* ai due lati della membrana e la *conduttanza dei canali*.

In base al valore del potenziale di membrana i canali si troveranno in un dato istante allo stato chiuso, allo stato aperto oppure allo stato inattivato. Normalmente i canali voltaggio dipendenti hanno una cinetica di attivazione molto veloce durante la fase di depolarizzazione: la

diminuzione della differenza di potenziale tra l'interno e l'esterno della membrana causa l'apertura dei canali del potassio ed il flusso di ioni, che genera una corrente in uscita destinata alla ripolarizzazione. L'inattivazione del canale è, invece, molto lenta rispetto all'attivazione e, una volta inattivato, il canale non consente più l'efflusso di ioni. Il canale hERG, a potenziali di membrana depolarizzati, si apre e conduce corrente in uscita, ma tale processo è rapidamente bloccato dal fenomeno di attivazione che impedisce l'ulteriore passaggio di corrente (Trudeau MC et al., 1995). Con l'iperpolarizzazione si ottiene la rimozione dell'inattivazione, il canale è riaperto ed il potassio fluisce attraverso di esso, in direzione opposta alla precedente: lo ione entra all'interno della cellula seguendo un gradiente elettrico generato dall'iperpolarizzazione (come mostrato in figura 5). Tale corrente, registrata durante la fase di ripolarizzazione, determina un  $V_m$  di -40 mV, valore di potenziale al quale il canale hERG è in grado, allo steady-state, di condurre una cospicua corrente in uscita. Nelle situazioni in cui hERG è il principale regolatore del potenziale di riposo, tenderà a bloccare il potenziale di membrana intorno a -40mV; questo potenziale risulta di cruciale importanza durante il ciclo cellulare; infatti le cellule in divisione sono solitamente più depolarizzate rispetto a quelle di riposo e ben differenziate (Binggeli R., Weinstein R., 1986).

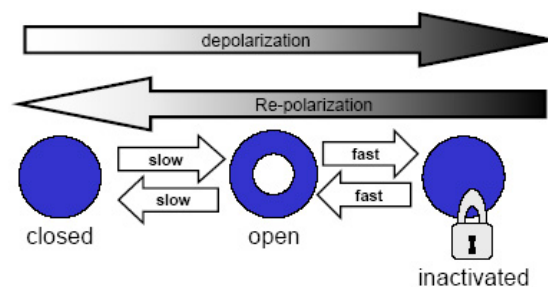


Figura 5: comportamento elettrofisiologico del canale hERG

Schönherr e Heinemann nel 1996 dimostrarono che la delezione di tutta la porzione amino-terminale di hERG causava un aumento della velocità di deattivazione (Schönherr R Heinemann SH, 1996). Dati più recenti evidenziano come la delezione degli aminoacidi 138-373 determini un'accelerazione nell'attivazione ed uno spostamento di  $V_{rest}$  verso valori più iperpolarizzati. Dopo la rimozione del dominio prossimale, rimangono pressoché inalterati sia la velocità di deattivazione sia quella di inattivazione, questo fa ritenere che il dominio sia uno degli elementi strutturali indispensabili per garantire la particolare cinetica di hERG1 a tal punto, da renderlo fondamentale per il mantenimento di  $V_{rest}$ , dell'eccitabilità e nella regolazione del firing neuronale e cardiaco (Viloria CG et al., 2000).

Diverse molecole possono bloccare l'azione dei canali hERG, in particolare i farmaci anti-aritmici di classe III, in grado di prolungare la durata del potenziale d'azione ed il periodo refrattario nei cardiomiociti. Tra questi il primo ad essere identificato come bloccante dei canali hERG è stato E4031 (Trudeau MC et al., 1995), in seguito dofetilide (Spector PS et al., 1996), sotalolo (Anderson JL Prystowsky EN, 1999) ed clofilium (Suessbrich H et al., 1997). In sede sperimentale i bloccanti più utilizzati sono: TEA (tetraetilammonio, bloccante aspecifico agisce su tutti i canali  $K^+$ -voltaggio dipendenti), cationi organici non permanenti (cesio, bario e magnesio con effetto aspecifico) e tossine di origine animale.

A partire dagli anni 80, con gli studi sui linfociti (DeCoursey TE et al., 1983) è apparsa evidente l'importanza dei canali di potassio nel controllo della proliferazione cellulare. Le prime indicazioni sul ruolo svolto dal canale hERG sulla proliferazione risalgono al 1995 con studi effettuati su cellule di neuroblastoma (Arcangeli A et al., 1995). Da questi studi sono emerse le caratteristiche biofisiche nonché la particolare cinetica di attivazione, correlate alle varie fasi del ciclo cellulare. Le cellule neoplastiche sono contraddistinte da bassi valori di  $V_{rest}$ , rispetto alle corrispondenti cellule sane, è stato quindi ipotizzato che questa

condizione sia essenziale per la proliferazione tumorale (Binggeli R Weinstein R, 1986).

Partendo dal dato che i canali hERG regolano il valore di  $V_m$ , sono stati condotti esperimenti per valutarne l'espressione anche in cellule tumorali; in un lavoro pubblicato alla fine degli anni 90 (Bianchi L et al., 1998) è stata dimostrata l'overespressione del gene *herg* in linee cellulari neoplastiche di diversa istogenesi, diversamente non è possibile registrare alcuna corrente mediata dai canali hERG nelle corrispondenti cellule sane, dove si registra una corrente di tipo IRK, che determina una iperpolarizzazione di  $V_{rest}$ . Dall'analisi di campioni di adenocarcinoma endometriale (Cherubini A et al., 2000) si è ottenuta, per la prima volta, la conferma della presenza, in tumori primari umani, del trascritto del gene *herg1* e della relativa proteina; successivi esperimenti di RT-PCR ed analisi immunoistochimica hanno dimostrato una forte presenza del gene e della proteina nei campioni di tumore rispetto al tessuto sano e iperplastico. Analisi elettrofisiologiche tramite patch-clamp su colture cellulari primarie, derivanti dagli stessi campioni, hanno confermato la presenza, sulla membrana delle cellule neoplastiche, di canali attivi in grado di generare la caratteristica corrente hERG-mediata.

Recentemente dati ottenuti da studi su precursori ematopoietici hanno evidenziato che, se stimolati alla proliferazione mediante citochine, questi esprimono hERG. Questo dato suggerisce che le correnti mediate dai canali hERG siano coinvolte nella regolazione dei meccanismi proliferativi. La valutazione clonogenica dell'unità formante colonia monocito-macrofagica, dopo stimolazione citochinica, in presenza di specifici bloccanti per le correnti  $I_{hERG}$  ha evidenziato una drastica diminuzione della crescita cellulare *in vitro*, lo stesso risultato è stato osservato su blasti di leucemia mielode, dove è emerso che l'isoforma iperespressa durante la fase S e coinvolta nella regolazione proliferativa è *herg1b* (Pillozzi S et al., 2002). I bloccanti specifici per i canali hERG inducono l'arresto del ciclo cellulare in fase G1, occorre precisare che tali effetti antiproliferativi sono stati osservati solo in cellule leucemiche

(Pillozzi S et al., 2002) e di neuroblastoma (Crociani O et al., 2003) esprimenti hERG1b.

I canali hERG risultano determinanti per l'acquisizione del fenotipo invasivo nei tumori solidi come i carcinomi del colon-retto (Lastraioli E et al., 2004), è quanto emerso da uno studio sulla migrazione cellulare di varie linee di carcinomi del colon, esprimenti a vari livelli *herg*. E' stata osservata una significativa riduzione della migrazione in presenza dell'inibitore specifico WAY, tanto più evidente nelle linee a maggiore espressione di *herg*. Questi dati hanno trovato conferma in ulteriori esperimenti utilizzando cloni a differente livello di espressione di *herg*; i cloni con alta espressione hanno dimostrato una maggiore capacità invasiva, almeno tre volte superiore ai cloni a bassa espressione, il bloccante WAY è in grado di ridurre significativamente il fenotipo invasivo. Ulteriore conferma a questi dati viene da osservazioni *in vivo*, infatti sia il gene *herg* che la relativa proteina sono espressi in un'alta percentuale di neoplasie coloretali con un'incidenza massima negli adenocarcinomi metastatici (90%) e nel 100% delle metastasi (Lastraioli E et al., 2004). Il ruolo regolatore dei canali hERG nei meccanismi di invasività può essere ricondotto alla dimostrata associazione funzionale tra hERG e le integrine  $\beta 1$  (Arcangeli A et al., 1993 e Hofman G et al., 2001). Un recente studio (Dolderer JH et al., 2009), confermando il lavoro di Lastraioli del 2004, ha esaminato una casistica di varie lesioni del colon-retto (mucosa sana, adenomi e carcinomi coloretali) con metodiche di RT-PCR e ed immunoistochimica. Il ruolo del canale è stato studiato anche in relazione alla proliferazione cellulare; da tali esperimenti è emerso che il trattamento con un inibitore specifico per il canale, E4031, riduce sensibilmente la proliferazione della linea cellulare Colo-205. La rilevazione di hERG1, al contrario dei marcatori CEA CK19 e CK20 presi in esame, mostra una alta sensibilità ed è pertanto candidato a poter essere utilizzato come bersaglio molecolare per nuovi protocolli terapeutici. In base a quanto emerso fino ad ora il canali hERG1 svolgono un importante ruolo nella proliferazione ed invasività cellulare sebbene non siano ancora



emerse correlazioni statisticamente significative con la stadiazione, DFS e OS.

L'elevata espressione di hERG in tumori altamente vascolarizzati, come gli astrocitomi, ha indotto a valutare le possibili interazioni di questo canale nel fenomeno di angiogenesi neoplastica. Su linee di glioblastoma è stata quantificata la secrezione del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in presenza/assenza di inibitori di hERG, rilevando che si otteneva una sostanziale riduzione della secrezione di VEGF solo in caso di elevata espressione di hERG. E' stato dedotto che il canale hERG sia in grado di modulare la secrezione di VEGF attraverso attività segnalatorie (Masi A et al., 2005). Nelle cellule tumorali si riscontrano elevate concentrazioni extra-cellulari di ioni  $K^+$  e ridotta tensione di ossigeno, queste condizioni favoriscono un aumento dell'attività dei canali hERG, conferendo un vantaggio selettivo alle cellule trasformate (Fontana L et al., 2001).

## DATI PRELIMINARI ALLA TESI

Dati recenti, ottenuti presso il laboratorio della Prof.ssa Arcangeli e non ancora pubblicati, hanno confermato la stretta relazione intercorrente tra VEGF e l'attività del canale hERG1. Esperimenti condotti su linee cellulari di cancro gastrico e di colon, esprimenti *hERG* vari livelli, hanno dimostrato che il canale regola la secrezione di VEGF. Somministrando alle colture cellulari bloccanti del canale è stato osservato un netto decremento della secrezione nelle linee trattate con E4031 (bloccante specifico per hERG1) diversamente da quelle trattate con bloccante aspecifico. A conferma di questo dato le stesse linee sono state trattate con diverse molecole di *small interfering* RNA per silenziare l'espressione di *hERG1* e successivamente è stata valutata la secrezione di VEGF, osservando anche in questo caso una netta diminuzione.

## SCOPO DELLA TESI

Il cancro colonrettale è la seconda neoplasia maligna viscerale in ordine di frequenza, con una incidenza equamente distribuita tra uomini e donne; tende a progredire lentamente ed una diagnosi precoce, con escissione chirurgica prima dell'interessamento linfonodale, permette una sopravvivenza a 5 anni fino al 90%. Al contrario, nei casi con interessamento linfonodale o di organi adiacenti, la sopravvivenza a 5 anni oscilla tra il 30 ed il 50%. Spesso il solo approccio chirurgico può non essere risolutivo ed è per questo che negli ultimi anni sono stati messi a punto nuovi protocolli terapeutici che integrano il trattamento chemio-radioterapico con nuovi farmaci biologici, in grado di potenziare l'effetto citotossico dei farmaci sulle cellule tumorali e rendere più gestibili gli effetti collaterali della terapia. I nuovi protocolli terapeutici contro il cancro del colon-retto vengono impiegati nella cura di pazienti con malattia in stadio III e IV, mentre esistono ancora riserve per il trattamento adiuvante di pazienti in stadio II, in cui la lesione è limitata alla *muscularis propria*, quindi senza infiltrazione di tessuti pericolici, né presenza di metastasi locoregionali o a distanza. Il trattamento adiuvante nei pazienti di stadio II è consigliato in presenza di fattori prognostici sfavorevoli quali le dimensioni della lesione, un alto grado di anaplasia, nonché perforazione e invasione vascolare o linfatica. L'individuazione di marcatori molecolari utilizzabili come fattori predittivi della prognosi o della sopravvivenza potrebbe offrire una possibilità di trattamento più mirato ed efficace nei confronti dei pazienti in stadio II ad alto rischio, per i quali esistono ancora forti riserve per una terapia adiuvante.

Lo studio e l'utilizzo di marcatori molecolari con metodiche di routine, come ad esempio tecniche di immunoistochimica, può facilitare il clinico

non solo nell'individuare e programmare il percorso terapeutico più idoneo per ogni paziente, ma anche nel selezionare quei soggetti che pur non risultando formalmente idonei, mostrano indicazioni prognostiche sfavorevoli. Uno o più marcatori, implicati in una particolare via segnalatoria, potrebbero rappresentare bersagli contro cui indirizzare farmaci mirati, in grado di potenziare l'effetto citotossico delle terapie classiche. Un protocollo di cura che integri radio-chemioterapia a terapie con farmaci biologici mirati potrebbe migliorare sensibilmente la qualità di vita e la sopravvivenza del paziente oncologico.

Lo scopo di questa tesi di dottorato è stato l'analisi dell'espressione e del ruolo di alcune proteine implicate nei fenomeni di proliferazione cellulare e trasformazione neoplastica su una casistica di adenocarcinomi del colon-retto.

E' stata valutata la presenza di hERG1, un canale di potassio voltaggio-dipendente, determinante per l'acquisizione del fenotipo invasivo nei tumori solidi. E' stata analizzata inoltre l'espressione di VEGF, la cui secrezione è modulata da hERG1. VEGF è un importante fattore angiogenetico implicato nei meccanismi di resistenza all'ipossia e di attivazione della risposta neoangiogenetica. Sono stati presi in esame altri due marcatori di ipossia, implicati nella risposta adattativa della cellula neoplastica a microambienti ipossici, nell'acquisizione di un fenotipo maligno e nello sviluppo di una maggiore aggressività: CAIX e Glut1.

Le analisi con tecniche di immunoistochimica per i marcatori d'interesse sono state condotte su campioni di lesione neoplastica e campioni di mucosa sana, provenienti da pazienti con sicura diagnosi di neoplasia coloretale ed operati presso la Divisione di Chirurgia Generale Oncologica - Dipartimento di Oncologia (Azienda Ospedaliera Universitaria di Careggi - Firenze). I dati così ottenuti sono stati elaborati statisticamente e correlati con i principali parametri di outcome, quali sopravvivenza (OS) e intervallo libero da malattia (DFS), nonché con numerosi parametri clinico-patologici quali il sesso, l'età, la sede e lo stadio della lesione, la presenza di interessamento linfonodale e

l'eventuale numero di linfonodi positivi, la presenza di espressioni colloidali. L'analisi statistica è stata condotta non solo analizzando ogni singolo marcatore, ma anche valutando l'associazione tra i vari markers al fine di poter individuare un eventuale pattern, prognostico o terapeutico, che mostri una significatività superiore a quella di ciascuno dei marcatori, preso singolarmente.

## ***MATERIALI E METODI***

I campioni presi in esame in questa tesi provengono da pazienti con diagnosi di adenocarcinoma del colon-retto, operati presso la Divisione di Chirurgia Generale Oncologica - Dipartimento di Oncologia (Azienda Ospedaliera Universitaria di Careggi - Firenze). Le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti sono riassunte in tabella 14. I campioni sono stati prelevati tra Settembre 2001 e Luglio 2008, di ciascun paziente si possiede il referto isto-patologico ed un follow-up.

La casistica è costituita da 192 casi, 89 uomini (46%) e 103 donne (54%). L'età media, compresa tra 40 e 90anni, è di 68 anni (mediana 66).

Sono stati esclusi i pazienti sottoposti a cicli di radioterapia e/o chemioterapia neoadiuvante e soggetti HCV positivi.

Il prelievo è stato effettuato subito dopo l'asportazione chirurgica, al fine di ridurre al minimo i rischi di ischemia e di deterioramento del campione. Per ogni paziente sono stati prelevati un frammento tumorale ed un frammento di mucosa sana, a non meno di 10 cm dalla lesione, entrambi posti subito in una soluzione al 3.6% di formaldeide in PBS 1X. In laboratorio i campioni sono stati processati per l'allestimento di sezioni istologiche.

CARATTERISTICA		N	%
SESSO	maschi	89	46
	femmine	103	54
ETA'	<55	24	13
	55-75	111	57
	>75	57	30
SEDE	colon destro	78	41
	colon trasverso	15	8
	colon sinistro	55	29
	retto	43	22
TNM	I	32	17
	II	65	34
	III	74	39
	IV	20	10
STADIO DI DUKES	A	31	16
	B	67	35
	C	72	38
	D	21	11
GRADING	G1	8	4
	G2	172	95
	G3	2	1

*Tabella14 : caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti presi in esame.*

## IMMUNOISTOCHEMICA

La formaldeide è uno dei fissativi più utilizzati, non precludendo alcuna indagine istologica, inoltre è contraddistinta da un alto grado di penetrazione ed una velocità di fissazione relativamente lenta (3/6 ore).

Dopo essere stati fissati in formalina e processati i campioni sono stati tagliati. Si è proceduto all'allestimento di vetrini, a carica positiva per ottimizzare l'adesione, con più sezioni di spessore 7µm. La presenza di

più sezioni su un vetrino ha permesso di valutare la presenza di reattività dei marcatori su piani contigui e quindi di poter correlare le eventuali aree marcate.

Prima di procedere all'analisi immunoistochimica sui vetrini viene eseguita una colorazione comune, ematossilina-eosina, per valutare l'integrità del campione e dell'architettura citologica.

I vetrini sono stati sparaffinati mediante tre passaggi da 5' in Histoclear e successivamente reidratati in una serie discendente di alcol: etanolo assoluto (Et-OH 100%), etanolo al 75%, etanolo al 50%, acqua bidistillata, ogni passaggio per un tempo di 5 minuti.

Successivamente si è provveduto al blocco delle perossidasi endogene mediante una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% in PBS 1X, posta sui vetrini per 20 minuti a temperatura ambiente. Allo scadere del tempo vengono effettuati due lavaggi della durata di 5 minuti ciascuno in PBS 1X. Le sezioni vengono trattate con Proteinasi K (Roche, 5µg/mL in PBS 1X) 4' a 37°C. La digestione enzimatica permette lo smascheramento antigenico. Seguono due lavaggi in PBS 1X. Segue un trattamento di 4 minuti con una soluzione UltraVBlock (LabVision) contenente 0.1% di Triton X100. L'UltraVBlock è in grado di bloccare i siti aspecifici, diminuendo il fondo che si può osservare nel vetrino al microscopio ottico, mentre il Triton favorisce la permeabilità di membrana grazie all'azione detergente. Seguono due lavaggi in PBS 1X. A questo punto si procede all'incubazione con anticorpi specifici a 4°C per tutta la notte (O/N). Gli anticorpi primari sono diluiti in una soluzione (1:10) di UltraVBlock-PBS 1X secondo il seguente schema:

α-hERG1	α-CAIX	α-VEGF	α-Glut1
1:100	1:100	1:100	1:100

Dopo un'incubazione O/N e due lavaggi in PBS 1X la rilevazione, 10 minuti a temperatura ambiente, viene effettuata con l'utilizzo di un kit



(PicTure Plus Kit, Invitrogen) reperibile in commercio, che sfrutta un polimero aminoacidico coniugato a molecole enzimatiche e contenenti frammenti Fab, il cui substrato è costituito dalla tetracloroidrato 3,3-diaminobenzidina (DAB). La DAB è il substrato della perossidasi coniugata all'anticorpo secondario, in seguito alla reazione enzimatica il substrato incolore viene convertito in un precipitato marrone. Il tempo di incubazione per il substrato è di 5'. La presenza del precipitato indica l'avvenuto legame tra l'anticorpo primario ed il secondario, tale reazione deve comunque essere controllata al MO. Al fine di migliorare l'individuazione della marcatura si procede ad una contro-colorazione con ematossilina di Meyer (per 5 minuti e viraggio in acqua di fonte), colorante contrastato rispetto alla colorazione del precipitato. Infine i vetrini subiscono una disidratazione in una serie discendente di alcol: acqua bidistillata, etanolo al 50%, etanolo al 75%, etanolo al 95% ed infine etanolo assoluto. Dopo due passaggi di 5 minuti ciascuno in Histoclear i vetrini vengono montati, ponendovi alcune gocce di Entellan (balsamo per microscopia a base di toluolo) ed il vetrino copri-oggetto. Dopo aver fatto asciugare i vetrini per alcune ore a temperatura ambiente si può procedere all'osservazione al microscopio.

Le reazioni immunoistochimiche devono essere sempre accompagnate da un controllo negativo su cui vengono effettuati tutti i passaggi del protocollo ad eccezione dell'incubazione con l'anticorpo primario, sostituito da un tampone inerte. Il controllo negativo è utile per escludere la presenza di falsi positivi dovuti alla metodica (pretrattamento, concentrazione dell'anticorpo primario, ecc) o al campione (presenza di una reazione non specifica ad esempio a causa delle perossidasi endogene).

I vetrini sono stati letti per intero. Non sono state considerate le cellule marcate alla periferia del campione, in quanto più deteriorabili durante le fasi del protocollo. Ogni campo è stato considerato positivo per la presenza di almeno il 10% di cellule neoplastiche marcate. E' stato attribuito uno score:

- assenza di cellule marcate SCORE 0
- 1-49% cellule marcate SCORE 1
- cellule marcate  $\geq 50\%$  SCORE 2

In un secondo tempo si è provveduto ad analizzare nuovamente tutti i campioni per la rilevazione della proteina-canale hERG, utilizzando un anticorpo monoclonale anti-hERG, prodotto in vitro (BD CellLine Bioreactor) presso il laboratorio della Prof.ssa Arcangeli. L'anticorpo monoclonale, diversamente dal policlonale, riconosce un'epitopo esterno alla membrana cellulare, questo permette di eliminare dal protocollo la fase di permeabilizzazione con Triton 100X, con un miglioramento sostanziale nella lettura dei vetrini, che appaiono molto più puliti e senza fondo. La marcatura appare comunque ben evidente e definita. L'anticorpo monoclonale è stato diluito 1:200 in una soluzione di UltraVBlock-PBS 1X e tenuto a 4°C O/N. Anche in questo caso la lettura al MO ha previsto l'attribuzione di un score analogo ai precedenti marcatori.

#### ANALISI STATISTICA

Le differenze di espressione dei vari marcatori in esame nelle mucose sane e negli adenocarcinomi sono stati valutati con il Test esatto di Fisher a due code e Test del  $\chi^2$ .

L'analisi multivariata per le correlazioni tra l'espressione di hERG (mono e policlonale), CAIX, VEGF e Glut1 ed i parametri clinico-patologici sono state valutate con test statistici il Test di Wilcoxon, Test di Regressione Logistica ed analisi bi- e multivariata di Cox.

Sono stati considerati statisticamente significativi valori di P inferiori a 0.05.

## ***RISULTATI***

Sono stati raccolti ed analizzati campioni derivanti da 192 pazienti (89 uomini e 103 donne) con sicura diagnosi di adenocarcinoma coloretale di età compresa tra 40 e 90 anni. Le caratteristiche della casistica sono riportate in tabella 1. Non rientrano in questa casistica pazienti HCV positivi o che avessero effettuato trattamenti neoadiuvanti. Al fine di tutelarne la riservatezza a ciascun paziente è stato assegnato un numero identificativo progressivo ed i dati relativi ad ogni caso sono stati inseriti in una tabella in modo da poter monitorare l'andamento della malattia ed aggiornare la casistica. Di ciascun paziente si conosce l'età e la data dell'intervento. Successivamente sono stati raccolti i referti istologici da cui ricavare informazioni sul tipo di lesione, le dimensioni, la stadiazione TNM, Dukes e Jass, il grado di anaplasia (non sempre riportato), la presenza di colloide e l'eventuale presenza di linfonodi positivi e/o metastasi. Dalla raccolta dei dati istologici è emerso che tre pazienti (donne) presentavano poliposi adenomatosa familiare, un paziente era affetto da diverticolite ed una paziente che, al momento dell'intervento, presentava una lesione cancerosa al pancreas. Si è cercato di seguire il decorso della malattia di ciascun paziente, aggiornando il follow-up. I dati ottenuti sono stati riportati come intervallo libero da malattia espresso in mesi (DFS), se al momento dell'ultimo controllo il paziente non presentava ricadute, nel caso contrario il dato veniva segnalato come recidiva. Inoltre si segnalava la sopravvivenza o l'eventuale decesso del paziente. Alcune persone dopo i primi controlli post-operatori possono decidere di effettuare i trattamenti chemioterapici nei comuni di residenza ed è per questo che per alcuni pazienti non è più possibile monitorare il decorso della malattia.

CARATTERISTICA		N	%
SESSO	maschi	89	46
	femmine	103	54
ETA'	<55	24	13
	55-75	111	57
	>75	57	30
SEDE	colon destro	78	41
	colon trasverso	15	8
	colon sinistro	55	29
	retto	43	22
TNM	I	32	17
	II	65	34
	III	74	39
	IV	20	10
STADIO DI DUKES	A	31	16
	B	67	35
	C	72	38
	D	21	11
GRADING	G1	8	4
	G2	172	95
	G3	2	1

*Tabella1 : caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti presi in esame.*

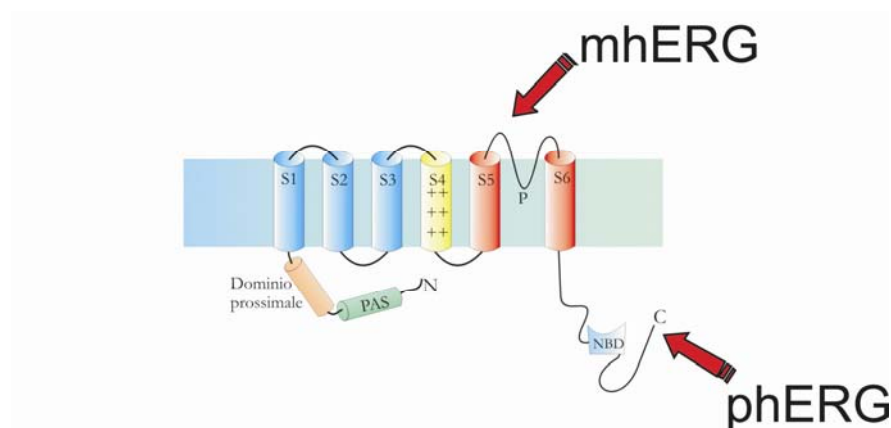
I campioni, così raccolti, sono stati analizzati con metodiche di immunoistochimica. Dopo le fasi di fissazione ed inclusione dei campioni la colorazione di controllo ha permesso di individuare 7 casi che non avevano i requisiti istologici per la rilevazione dei marcatori, a causa delle condizioni di degradazione del campione o per la presenza di solo tessuto connettivale o stroma.

Tutti i 185 campioni sono stati analizzati per la rilevazione dei marcatori in esame. Si è provveduto ad allestire vetrini con fette contigue (una sezione per marcatore) in modo da poter effettuare comparazioni sulle aree

marcate. Inoltre sono sempre stati allestiti controlli negativi preferibilmente sullo stesso vetrino su cui venivano analizzati i marcatori.

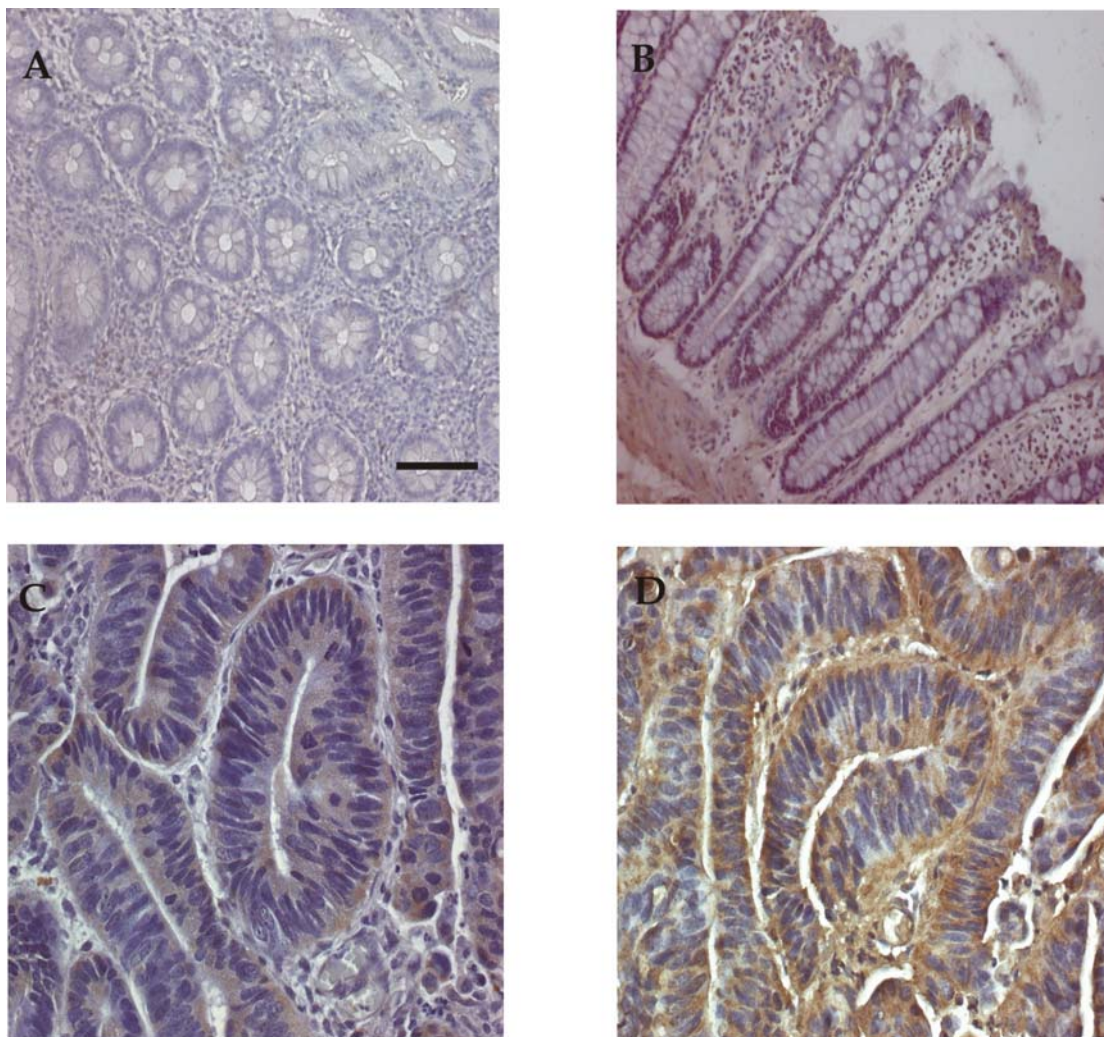
### hERG

L'analisi per la valutazione sull'espressione del canale hERG1 è stata condotta mediante l'utilizzo di due specifici anticorpi, un anticorpo policlonale, che riconosce una regione della porzione carbossiterminale intracitoplasmatica della proteina ed un anticorpo monoclonale che riconosce un epitopo esterno nella regione S5-poro (figura 1).



*Figura 1: siti specifici per anticorpi anti-hERG1. mhERG1: monoclonale, phERG1: policlonale*

Come mostrato in figura 2 nella mucosa sana non è presente alcuna marcatura. Nel campione di adenocarcinoma, invece, si osservano ampie zone con marcatura diffusa citoplasmatica ed a livello della membrana, alternate a strutture ghiandolari negative; inoltre nel campione analizzato con anticorpo monoclonale si nota una totale assenza di fondo che rende la marcatura più evidente. Di seguito in figura 3 e 4 vengono riportate immagini di adenocarcinomi a diverso ingrandimento (5x e 20x) con attribuzione di uno score.



*Figura 2: immunoistochimica con anticorpo anti-hERG1: A: mucosa sana (20X) – anticorpo anti-hERG1 monoclonale, diluizione 1:200; B: mucosa sana – anticorpo anti-hERG1 policlonale, diluizione 1:100; C: adenocarcinoma del colon-retto (40X) - anticorpo anti-hERG1 monoclonale, diluizione 1:200; D: adenocarcinoma del colon-retto (40X) – anticorpo anti-hERG1 policlonale, diluizione 1:100; Barra = 200 μm.*



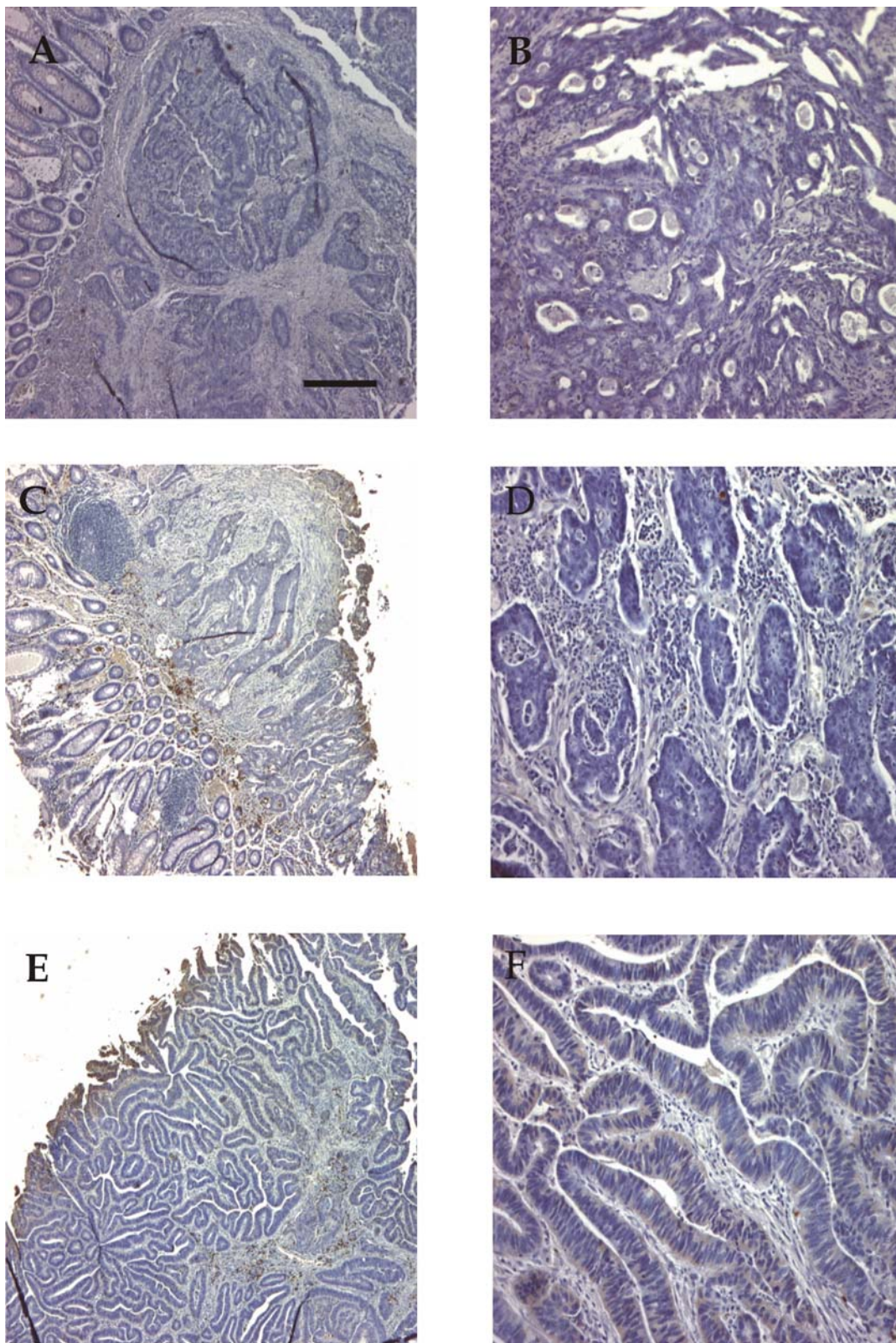
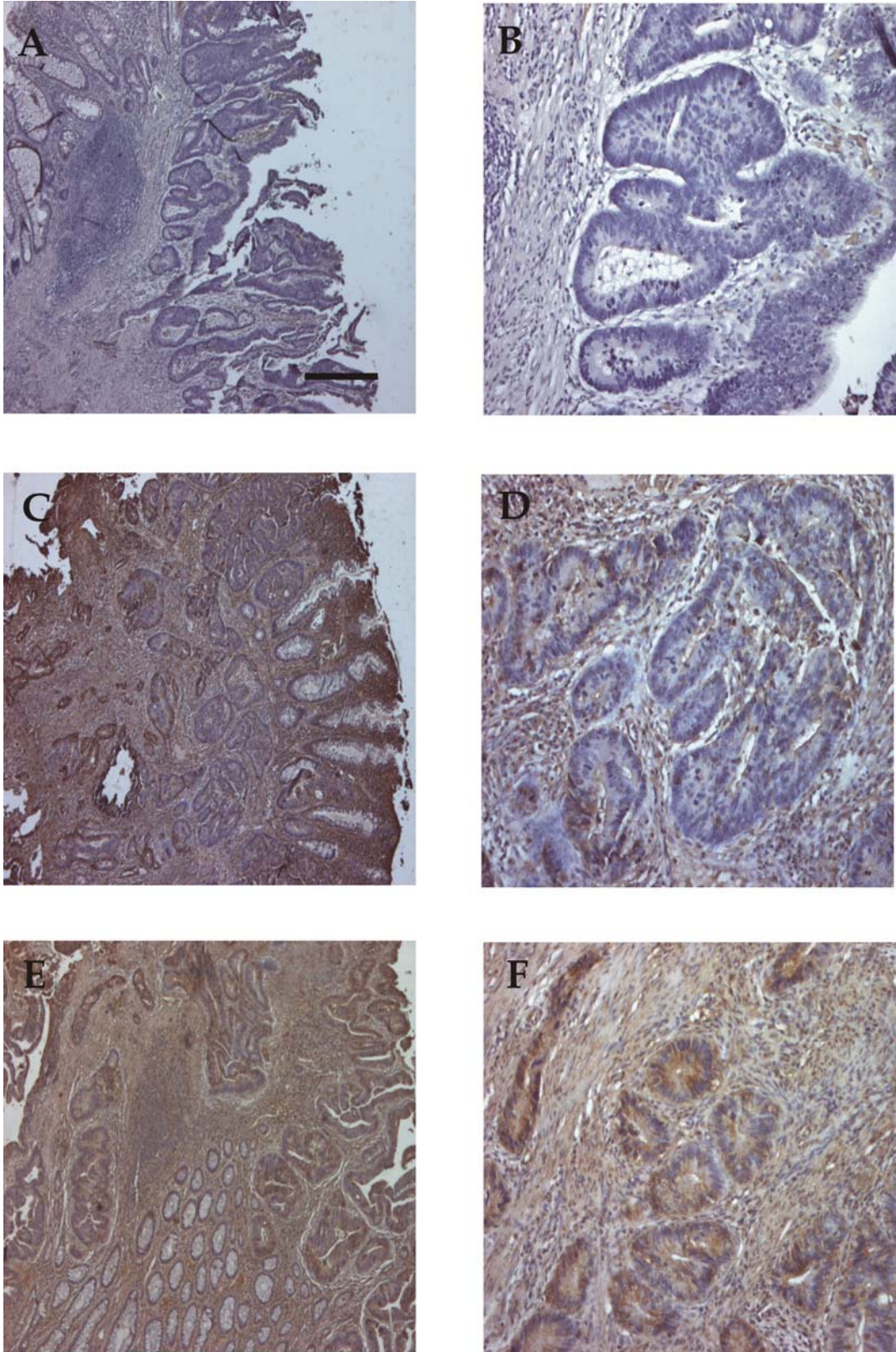


Figura 3: immagini di campioni di adenocarcinoma coloretale rilevati con anticorpo monoclonale e con attribuzione di uno score. Pannello A e B: score 0 (ingrandimento 5x e 20x); pannello C e D: score 1 (ingrandimento 5x e 20x); pannello E e F: score 2 (ingrandimento 5x e 20x).





*Figura 4: immagini di campioni di adenocarcinoma coloretale rilevati con anticorpo policlonale e con attribuzione di uno score. Pannello A e B: score 0 (ingrandimento 5x e 20x); pannello C e D: score 1 (ingrandimento 5x e 20x); pannello E e F: score 2 (ingrandimento 5x e 20x).*



Dei 185 campioni esaminati 126 sono risultati positivi alla rilevazione immunoistochimica con l'anticorpo policlonale, 98 sono risultati positivi alla rilevazione con monoclonale. Ogni campione è stato valutato positivo se risultavano marcate almeno il 10% delle cellule, è stato inoltre attribuito uno score: 0 (campione negativo), 1 (campione positivo 1-49% di cellule marcate), 2 (campione positivo con più del 50% di cellule marcate). Le discrepanze emerse sono imputabili alla diversa natura degli anticorpi, la mancanza di fondo ed una marcatura più definita rendono la lettura dei dati, ottenuti con l'anticorpo monoclonale anti-hERG1 migliore ed il rischio di falsi positivi esiguo.

E' stata condotta una prima valutazione statistica mediante Test esatto di Fisher a due code per la valutazione dei risultati ottenuti con la rilevazione immunoistochimica di hERG1. L'analisi ha indicato una differenza statisticamente significativa tra espressione di hERG1 negli adenocarcinomi e nelle mucose sane ( $P < 0.001$ ), inoltre è emerso una concordanza statisticamente significativa nella rilevazione con i due anticorpi ( $P < 0.001$ ). In accordo con i risultati ottenuti nel laboratorio della Prof.ssa Arcangeli, relativi alla caratterizzazione di linee cellulari e tumori primari di diversa istogenesi, è stata evidenziata una correlazione altamente significativa tra l'espressione di hERG1 e VEGF ( $P < 0.001$ ). Analizzando i dati ottenuti con l'anticorpo policlonale sono emerse correlazioni significative tra l'espressione di hERG1 e CAIX negativa ( $P = 0.001$ ) e con Glut1 negativo ( $P < 0.001$ ). Analogamente i risultati ottenuti con l'anticorpo monoclonale hanno confermato pienamente le correlazioni tra l'espressione del canale ed i due marcatori di ipossia. Le correlazioni tra i marcatori emerse dall'analisi preliminare, sono riportate in tabella 2. Di seguito è riportata anche la valutazione statistica preliminare dei dati ottenuti dal monoclonale considerando una soglia di positività superiore al 50% (vedi tabella 3). Come si può osservare i risultati confermano i dati riportati in tabella 2 e viene raggiunta la significatività statistica anche nella correlazione tra hERG1 e CAIX.

	<b>mhERG</b>	<b>phERG</b>	<b>VEGF</b>	<b>CAIX</b>	<b>GLUT1</b>
<b>mhERG</b>		<0.001*	<0.001*	0.088	0.004*
<b>phERG</b>	<0.001*		<0.001*	0.738	0.252
<b>VEGF</b>	<0.001*	<0.001*		0.009*	0.003*
<b>CAIX</b>	0.088	0.738	0.009*		0.073
<b>GLUT1</b>	0.004*	0.252	0.003*	0.073	

Tabella 2: correlazioni statistiche tra i marcatori in esame. L'asterisco evidenzia le correlazioni significative, con  $p < 0.05$

	<b>mhERG</b>
<b>phERG</b>	<0.001*
<b>VEGF</b>	0.010*
<b>CA IX</b>	0.046*
<b>GLUT1</b>	0.020*

Tabella 3: correlazioni tra l'espressione del monoclonale con score 2 in relazione ai marcatori in esame.

L'analisi statistica non ha evidenziato alcuna rilevante correlazione tra l'espressione del canale e parametri clinico-patologici e di stadiazione. Dalle analisi dei dati ottenuti con l'anticorpo monoclonale non sono emerse correlazioni significative sia utilizzando una soglia di positività superiore al 10% (tabella 4), sia innalzando la soglia oltre il 50% (tabella 5).

Caratteristiche		m-hERG1 pos	m-hERG1 neg	p
Età	≤ 65	41 (56.94%)	31 (43.06%)	0.545
	≥ 66	53 (48.18%)	57 (51.82%)	
Sesso	Uomini	45 (52.94%)	40 (47.06%)	0.882
	Donne	53 (54.64%)	44 (45.36%)	
Sede	colon destro	36 (49.32%)	37 (50.68%)	0.246
	trasverso	11 (73.33%)	4 (26.67%)	
	colon sinistro	31 (59.62%)	21 (40.38%)	
	retto	20 (47.62%)	22 (46.15%)	
Dukes	A	20 (64.52%)	11 (35.48%)	0.517
	B	35 (54.69%)	29 (45.31%)	
	C	34 (50.75%)	33 (49.25%)	
	D	9 (45.00%)	11 (55.00%)	
Stadio TNM	I	20 (62.50%)	12 (37.50%)	0.665
	IIA	34 (54.84%)	28 (45.16%)	
	IIB	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
	IIIA	5 (71.43%)	2 (28.57%)	
	IIIB	16 (51.61%)	15 (48.39%)	
	IIIC	15 (48.39%)	16 (51.61%)	
	IV	8 (42.11%)	11 (57.89%)	
Colloide	sì	26 (54.17%)	22 (45.83%)	1.000
	no	72 (53.73%)	62 (46.27%)	
Grading	G1	2 (25%)	6 (75%)	0.179
	G2	86 (56.21%)	67 (43.79%)	
	G3	1 (100.00%)	0 (0.00%)	
	n.d.	9 (45.00%)	11 (55.00%)	
Interessamento linfonodale	no	57 (58.76%)	40 (41.24%)	0.181
	sì	41 (48.24%)	44 (51.76%)	

Tabella 4: correlazioni statistiche tra l'espressione di hERG1, rilevato con l'anticorpo monoclonale e parametri clinici e di stadiazione.

Caratteristiche		m-hERG1 <49%	m-hERG1 >50%	p
Età	≤ 65	51 (70.83%)	21 (29.17%)	0.384
	≥ 66	85 (77.27%)	25 (22.73%)	
Sesso	Uomini	67 (78.82%)	18 (21.18%)	0.305
	Donne	69 (71.13%)	28 (28.87%)	
Sede	colon destro	56 (76.71%)	17 (23.29%)	0.271
	trasverso	10 (66.67%)	5 (33.33%)	
	colon sinistro	35 (67.31%)	17 (32.69%)	
	retto	35 (83.33%)	7 (16.67%)	
Dukes	A	23 (74.19%)	8 (25.81%)	0.734
	B	46 (71.88%)	18 (28.13%)	
	C	50 (74.63%)	17 (25.37%)	
	D	17 (85.00%)	3 (15.00%)	
Stadio TNM	I	23 (71.88%)	9 (28.13%)	0.569
	IIA	45 (72.58%)	17 (27.42%)	
	IIB	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
	IIIA	4 (57.14%)	3 (42.86%)	
	IIIB	24 (77.42%)	7 (22.58%)	
	IIIC	23 (74.19%)	8 (25.81%)	
	IV	17 (89.47%)	2 (10.53%)	
Colloide	sì	38 (79.17%)	10 (20.83%)	0.446
	no	98 (73.13%)	36 (26.87%)	
Grading	G1	7 (87.50%)	1 (12.50%)	0.782
	G2	112 (73.20%)	41 (26.80%)	
	G3	1 (100.00%)	0 (0.00%)	
	n.d.	16 (80.00%)	4 (20.00%)	
Interessamento linfonodale	no	69 (71.13%)	28 (28.87%)	0.305
	sì	67 (78.82%)	18 (21.18%)	

Tabella 5: correlazioni statistiche tra l'espressione di hERG1, rilevato con l'anticorpo monoclonale con score 2 e parametri clinici e di stadiazione.

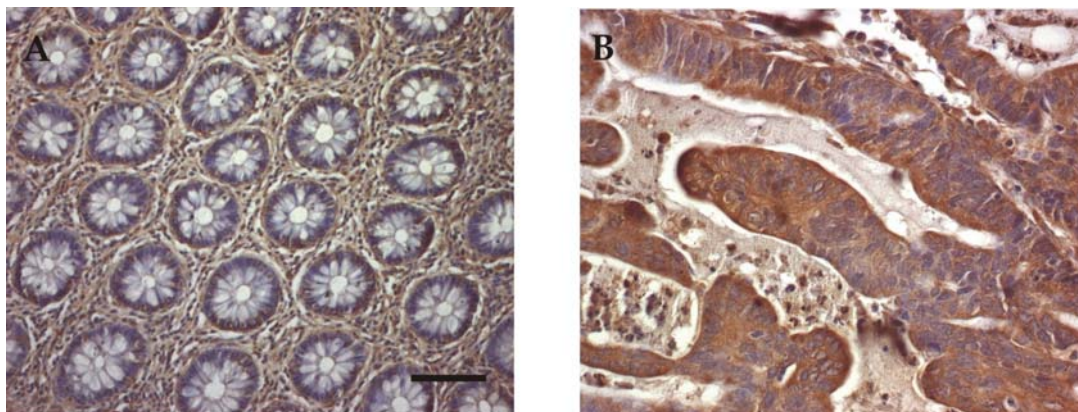
Caratteristiche		p-hERG1 pos	p-hERG1 neg	p
Età	≤ 65	48 (66.67%)	24 (33.33%)	0.872
	≥ 66	76 (68.47%)	35 (31.53%)	
Sesso	Uomini	62 (72.09%)	24 (27.91%)	0.269
	Donne	62 (63.92%)	35 (36.08%)	
Sede	colon destro	44 (60.27%)	29 (39.73%)	0.208
	trasverso	13 (86.67%)	2 (13.33%)	
	colon sinistro	37 (71.15%)	15 (28.85%)	
	retto	30 (69.77%)	13 (30.23%)	
Dukes	A	22 (70.97%)	9 (29.03%)	0.761
	B	44 (68.75 %)	20 (31.25%)	
	C	43 (63.24%)	25 (36.76%)	
	D	15 (75.00%)	5 (25.00%)	
Stadio TNM	I	23 (71.88%)	9 (28.13%)	0.950
	IIA	42 (67.74%)	20 (32.26%)	
	IIB	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
	IIIA	5 (71.43%)	2 (28.57%)	
	IIIB	21 (65.63%)	11 (34.38%)	
	IIIC	19 (61.29%)	12 (38.71%)	
	IV	14 (73.68%)	5 (28.32%)	
Colloide	sì	27 (56.25%)	21 (43.75%)	0.051*
	no	97 (71.85%)	38 (28.15%)	
Grading	G1	3 (37.50%)	5 (62.50%)	0.003*
	G2	112 (72.73%)	42 (27.27%)	
	G3	1 (100.00%)	0 (0.00%)	
	n.d.	8 (40.00%)	12 (60.00%)	
Interessamento linfonodale	no	68 (70.10%)	29 (29.90%)	0.527
	sì	56 (65.12%)	30 (34.88%)	

Tabella 6: correlazioni statistiche tra l'espressione di hERG1, rilevato con l'anticorpo policlonale e parametri clinici e di stadiazione.

Al contrario nei dati ottenuti con il policlonale l'espressione di hERG1 correla con il G3 (elevato grado di anaplasia) e mostra una correlazione ai limiti della significatività con l'assenza di colloide, come mostrato in tabella 6.

## VEGF

Tutti i 185 casi sono stati esaminati con un anticorpo policlonale anti-VEGFA. Come mostrato in figura 5 la mucosa colica non presenta marcatura, sebbene si osservi la presenza di una marcatura di fondo nello stroma circostante le strutture ghiandolari. Le lesioni adenocarcinomatose, invece mostrano una marcatura intensa e diffusa a livello citoplasmatico.



*Figura 5: immunoistochimica con anticorpo anti-VEGF: A: mucosa sana (20X) – anticorpo anti-VEGF, diluizione 1:100; B: adenocarcinoma del colon (40X) - anticorpo anti-VEGF, diluizione 1:100; Barra = 200  $\mu$ m.*

In accordo con i dati presenti in letteratura l'81% dei casi è risultato positivo (149 pazienti). Sebbene in letteratura si trovino studi che riportano letture con score al di sopra o al di sotto del 50%, in questo lavoro è stato deciso di attribuire il solo valore positivo-negativo, anche in relazione all'entità della marcatura, che quando presente è diffusa in tutto il campione.

L'analisi statistica preliminare effettuata con test esatto di Fisher a due code ha rilevato una correlazione altamente significativa con l'espressione del canale hERG1 ( $P < 0.001$ ), rilevata con entrambi gli anticorpi. Sono emerse anche correlazioni statisticamente significative con l'assenza di espressione del marcatore Glut1 ( $P = 0.003$ ), con CAIX ( $P = 0.009$ ), come precedentemente mostrato in tabella 2. Non sono emerse correlazioni statisticamente significative con parametri clinico-patologici e di stadiazione come evidenziato in tabella 7.

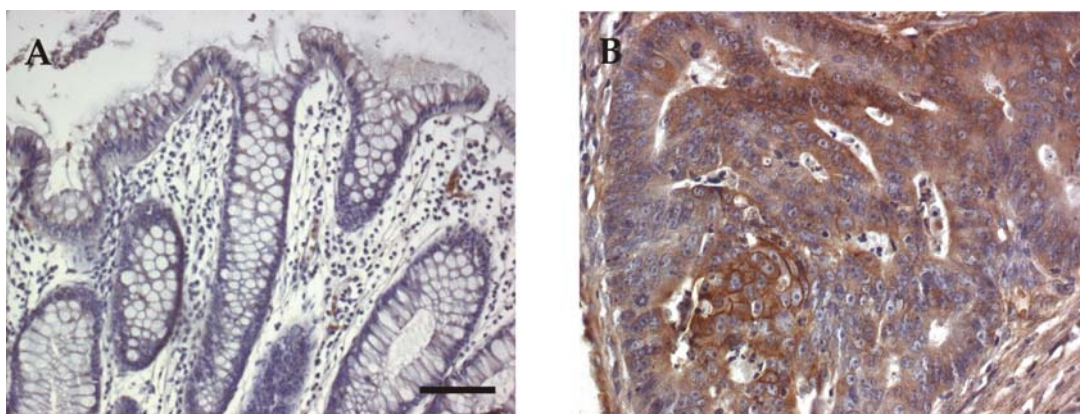
Caratteristiche		VEGF pos	VEGF neg	p
Età	≤ 65	54 (33.33%)	18 (25.00%)	0.125
	≥ 66	94 (84.68%)	17 (15.32%)	
Sesso	Uomini	70 (81.40%)	16 (18.60%)	1.000
	Donne	78 (80.41%)	19 (19.59%)	
Sede	colon destro	52 (71.23%)	21 (28.77%)	0.074
	trasverso	13 (86.67%)	2 (13.33%)	
	colon sinistro	46 (88.46%)	6 (11.54%)	
	retto	37 (86.05%)	6 (13.95%)	
Dukes	A	26 (83.87%)	5 (16.13%)	0.613
	B	52 (81.25%)	12 (18.75%)	
	C	56 (82.35%)	12 (17.65%)	
	D	14 (70.00%)	6 (30.00%)	
Stadio TNM	I	27 (84.38%)	5 (15.63%)	0.810
	IIA	50 (80.65%)	12 (19.35%)	
	IIB	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
	IIIA	6 (85.71%)	1 (14.29%)	
	IIIB	26 (85.25%)	6 (18.75%)	
	IIIC	26 (83.87%)	5 (16.13%)	
	IV	13 (68.42%)	6 (31.58%)	
Colloide	sì	38 (79.17%)	10 (20.83%)	0.831
	no	110 (81.48%)	25 (18.52%)	
Grading	G1	7 (87.50%)	1 (12.50%)	0.536
	G2	126 (81.82%)	28 (18.18%)	
	G3	1 (100.00%)	0 (0.00%)	
	n.d.	14 (70.00%)	7 (30.00%)	
Interessamento linfonodale	no	80 (82.47%)	17 (17.53%)	0.578
	sì	68 (79.07%)	18 (20.93%)	

Tabella 7: correlazioni statistiche tra l'espressione di VEGF e parametri clinici e di stadiazione.



## Glut1

La rilevazione immunoistochimica del trasportatore di glucosio è stata condotta con l'utilizzo di un anticorpo policlonale anti-Glut1 ed è risultata positiva in 65 casi su 185. Non è stata registrata alcuna marcatura a livello delle cellule della mucosa colica sana, mentre è rilevabile una marcatura tipica sugli eritrociti (come mostrato nel pannello A). I campioni di adenocarcinoma mostrano positività per la reazione a livello della membrana citoplasmatica. Si evidenzia una marcatura di tipo focale (che interessa piccole aree o piccoli gruppi di cellule), in cui strutture ghiandolari marcate si alternano ad ampie zone non marcate (figura 6). Anche in questo caso si è provveduto ad attribuire un valore positivo-negativo alla lettura dei vetrini.



*Figura 6: immunoistochimica con anticorpo anti-Glut1: A: mucosa sana (20X) - anticorpo anti-Glut1, diluizione 1:100; B: adenocarcinoma del colon (40X) - anticorpo anti-Glut1, diluizione 1:100; Barra = 200  $\mu$ m.*

L'analisi statistica preliminare, effettuata con test esatto di Fisher a due code ha evidenziato una correlazione statisticamente significativa con l'espressione del canale hERG1 ( $P=0.004$ ) rilevato mediante anticorpo monoclonale, la relazione tra l'espressione di Glut1 e di hERG1 rilevata con il policlonale non è significativa ( $P=0.252$ ), questi dati sono riportati in tabella 2. Non sono emerse correlazioni significative tra l'espressione del singolo marcatore e i parametri clinici (tabella 8).

Caratteristiche		GLUT1 pos	GLUT1 neg	p
Età	≤ 65	32 (44.44%)	40 (55.56%)	0.057
	≥ 66	38 (29.73%)	78 (70.27%)	
Sesso	Uomini	32 (37.21%)	54 (62.79%)	0.757
	Donne	33 (34.02%)	64 (65.98%)	
Sede	colon destro	25 (34.25%)	48 (65.75%)	0.130
	trasverso	6 (40.00%)	9 (60.00%)	
	colon sinistro	24 (46.15%)	28 (53.85%)	
	retto	10 (23.36%)	33 (76.74%)	
Dukes	A	12 (38.71%)	19 (61.29%)	0.318
	B	19 (26.69%)	45 (70.31%)	
	C	29 (42.65%)	39 (57.35%)	
	D	5 (25.00%)	15 (75.00%)	
Stadio TNM	I	11 (34.38%)	21 (65.63%)	0.148
	IIA	19 (30.65%)	43 (69.35%)	
	IIB	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
	IIIA	4 (57.14%)	3 (42.86%)	
	IIIB	17 (53.13%)	15 (46.88%)	
	IIIC	10 (32.26%)	21 (67.74%)	
	IV	4 (21.05%)	15 (78.95%)	
Colloide	sì	13 (27.08%)	35 (72.92%)	0.165
	no	52 (38.52%)	83 (61.48%)	
Grading	G1	1 (12.50%)	7 (87.50%)	0.254
	G2	57 (37.01%)	97 (62.99%)	
	G3	1 (100.00%)	0 (0.00%)	
	n.d.	6 (30.00%)	14 (70.00%)	
Interessamento linfonodale	no	33 (34.02%)	64 (65.98%)	0.757
	sì	32 (37.21%)	54 (62.79%)	

Tabella 8: correlazioni statistiche tra l'espressione di Glut1, rilevato con l'anticorpo policlonale e parametri clinici e di stadiazione.

Sulla base di informazioni riportate sui referti istologici (dati non sempre presenti) è stato possibile effettuare un'analisi statistica per valutare eventuali associazioni tra Glut1 e l'interessamento linfonodale. E' emersa una correlazione statisticamente significativa ( $P=0.006$ ). Il 67% circa dei pazienti N0 risulta Glut1 negativo, l'espressione aumenta (64%) in modo significativo all'inizio dell'interessamento linfonodale per poi diminuire sensibilmente all'aumentare del numero di linfonodi positivi, come mostrato in tabella 9.

Linfonodi Patologici	GLUT1 neg	GLUT1 pos	p
0	40 (66.67%)	20 (33.33%)	0.006*
1-3	10 (35.71%)	18 (64.29%)	
4-7	4 (80%)	1 (20%)	
>7	3 (100.00%)	0 (0.00%)	

Tabella 9: espressione di Glut1 in funzione dell'interessamento linfonodale. \* valore statisticamente significativo.

### CAIX

L'analisi immunoistochimica è stata effettuata mediante anticorpo monoclonale anti-CAIX. Nei campioni di mucosa colica sana non è rilevabile marcatura, mentre nei campioni di adenocarcinoma è presente una marcatura di tipo focale a livello della membrana plasmatica, come mostrato in figura 7. Sono risultati positivi alla rilevazione immunoistochimica 60 campioni su 185.

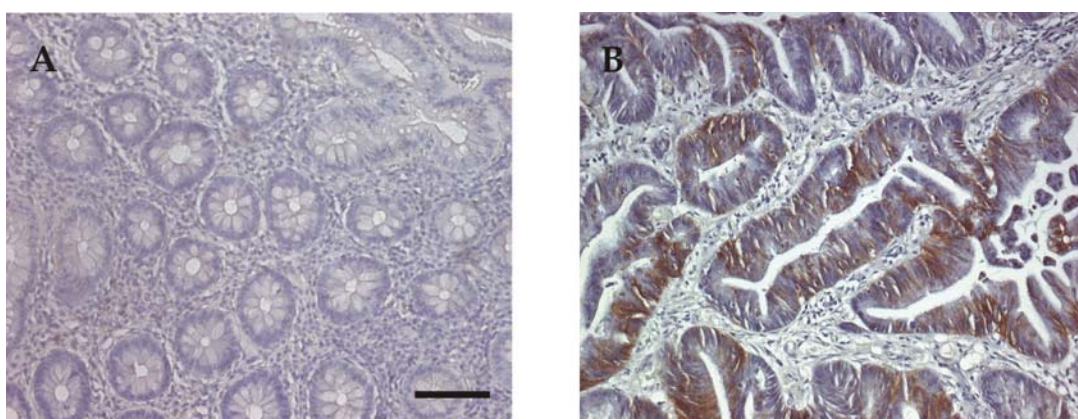


Figura 7: immunoistochimica con anticorpo anti-CAIX: **A:** mucosa sana (20X) - anticorpo anti-CAIX, diluizione 1:100; **B:** adenocarcinoma del colon (40X) - anticorpo anti-CAIX, diluizione 1:100; Barra = 200  $\mu$ m.

L'analisi statistica preliminare condotta con il test esatto di Fisher a due code ha evidenziato una correlazione significativa con l'espressione di VEGF ( $P=0.009$ ) ed una correlazione al limite della significatività ( $P=0.088$ ) con l'espressione di hERG1 analizzato con il monoclonale (dato precedentemente riportato in tabella 2). Non sono emerse correlazioni statisticamente significativi con parametri di stadiazione o clinico-patologici (come riportato in tabella 10).

Caratteristiche		CA IX pos	CA IX neg	p
Età	≤ 65	24 (33.33%)	48 (66.67%)	1.000
	≥ 66	36 (32.43%)	75 (67.57%)	
Sesso	Uomini	28 (32.56%)	58 (67.44%)	1.000
	Donne	32 (32.99%)	65 (67.01%)	
Sede	colon destro	30 (41.10%)	43 (58.90%)	0.257
	trasverso	5 (33.33%)	10 (66.67%)	
	colon sinistro	14 (26.92%)	38 (73.08%)	
	retto	11 (25.58%)	32 (74.42%)	
Dukes	A	22 (70.97%)	23 (74.19%)	0.132
	B	44 (68.75 %)	43 (67.19%)	
	C	43 (63.24%)	40 (58.82%)	
	D	15 (75.00%)	17 (85.00%)	
Stadio TNM	I	9 (28.13%)	23 (71.88%)	0.174
	IIA	20 (32.26%)	42 (67.74%)	
	IIB	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
	IIIA	5 (71.43%)	2 (28.57%)	
	IIIB	12 (37.50%)	20 (62.50%)	
	IIIC	11 (35.48%)	20 (64.52%)	
	IV	3 (15.79%)	16 (84.21%)	
Colloide	sì	21 (43.75%)	27 (56.25%)	0.074
	no	39 (28.39%)	96 (71.11%)	
Grading	G1	4 (50.00%)	4 (50.00%)	0.343
	G2	48 (31.17%)	106 (68.83%)	
	G3	1 (100.00%)	0 (0.00%)	
	n.d.	7 (35.00%)	13 (65.00%)	
Interessamento linfonodale	no	30 (30.93%)	67 (69.07%)	0.637
	sì	30 (34.88%)	56 (65.12%)	

Tabella 10: correlazioni statistiche tra l'espressione di CAIX e parametri clinici e di stadiazione.

## VALUTAZIONE STATISTICA

Al termine delle analisi di immunoistochimica per tutti e quattro i marcatori in esame sono state effettuate valutazioni statistiche più approfondite. Sono state indagate eventuali correlazioni tra uno o più marcatori e parametri clinico-patologici e di stadiazione in funzione della sopravvivenza a 5 anni. A tale proposito la casistica è stata controllata e dove possibile ulteriormente aggiornata. I controlli di qualità effettuati preliminarmente hanno portato ad escludere i pazienti che erano deceduti il giorno dell'intervento, coloro di cui non si avevano dati di sopravvivenza, la paziente con lesione cancerosa sincrona al pancreas, nonché i pazienti con malattia in stadio Dukes D, non potendo essere considerati nell'analisi dell'intervallo libero da malattia (DFS) a causa della presenza di metastasi già al momento della diagnosi. Inoltre sono stati esclusi quei casi per cui non è stato possibile effettuare la rilevazione con il monoclonale, in questi pazienti, infatti, il campione prelevato era di piccole dimensioni e non è stato sufficiente per tutte le analisi. Le valutazioni statistiche sono state condotte su una casistica di 125 pazienti: 68 donne e 57 uomini, con un'età media di  $67.9 \pm 0.98$  anni, in un intervallo compreso tra 40 e 90 anni. I dati sono stati stratificati secondo gli stadi di Dukes. La valutazione della stadiazione secondo Dukes e secondo i criteri TNM ha evidenziato una perfetta colinearità, pertanto è stato scelto la stadiazione di Dukes. In base alle letture dei vetrini trattati con due diversi anticorpi anti-hERG1 ed osservando la migliore qualità dei dati ottenuti con l'anticorpo monoclonale (marcatura più definita ed assenza di fondo) è stato deciso di utilizzare questi ultimi per le indagini statistiche, inoltre sono stati inseriti in una unica classe i pazienti a cui era stato attribuito uno score 0 e 1 (1-49% di cellule marcate).

Sono stati effettuati test di Wilcoxon, test di Fisher a due code e test del  $\chi^2$  per valutare l'associazione tra i marcatori ed i parametri clinici ed analisi bi- multivariata di Cox, aggiustata per stadi di Dukes, per valutare il ruolo prognostico dei fattori molecolari e clinici sulla sopravvivenza complessiva. Nell'analisi statistica multivariata sono stati considerati

statisticamente significativi valori di P inferiori a 0.20. Di seguito vengono riportate le correlazioni di ciascun marcatore con i parametri clinici e di stadiazione.

Caratteristiche		m-hERG1 pos	m-hERG1 neg	p
Età	≤ 65	11 (39%)	38 (39%)	1.000
	≥ 66	17 (61%)	59 (61%)	
Sesso	Uomini	12 (43%)	45 (46%)	0.8308
	Donne	16 (57%)	52 (54%)	
Sede	colon destro	13 (46%)	40 (41%)	0.6318°
	trasverso	4 (14.5%)	9 (9%)	
	colon sinistro	7 (25%)	24 (25%)	
	retto	4 (14.5%)	24 (25%)	
Dukes	A	7 (25%)	21 (22%)	0.7720°
	B	11 (39%)	34 (35%)	
	C	10 (36%)	42 (43%)	
Colloide	sì	5 (18%)	27 (28%)	0.3354
	no	23 (82%)	70 (72%)	
VEGF	positivi	25 (25%)	3 (12%)	0.2781
	negativi	76 (75%)	21 (88%)	
Glut1	positivi	14 (32%)	14 (17%)	0.0746*
	negativi	30 (68%)	67 (83%)	
CAIX	positivi	11 (30%)	17 (19%)	0.2418
	negativi	26 (70%)	71 (81%)	

Tabella 11: associazione tra hERG1 ed i maggiori fattori biologici.° Il valore di p è stato calcolato con il test  $\chi^2$ .

Caratteristiche		VEGF pos	VEGF neg	p
Età	≤ 65	37 (37%)	12 (50%)	0.2513
	≥ 66	64 (63%)	12 (50%)	
Sesso	Uomini	46 (46%)	11 (46%)	1.000
	Donne	55 (54%)	13 (54%)	
Sede	colon destro	39 (38%)	14 (58%)	0.3722°
	trasverso	11 (11%)	2 (8%)	
	colon sinistro	27 (27%)	4 (17%)	
	retto	24 (24%)	4 (17%)	
Dukes	A	23 (23%)	5 (21%)	0.8116
	B	35 (35%)	10 (42%)	
	C	43 (42%)	9 (37%)	
Colloide	sì	25 (25%)	7 (29%)	0.7950
	no	76 (75%)	17 (71%)	
mhERG1	positivi	25 (25%)	3 (12%)	0.2781
	negativi	76 (75%)	21 (88%)	
Glut1	positivi	39 (89%)	62 (77%)	0.1527
	negativi	5 (11%)	19 (23%)	
CAIX	positivi	33 (89%)	68 (77%)	0.1427
	negativi	4 (11%)	20 (23%)	

Tabella 12: associazione tra VEGF ed i maggiori fattori biologici .° Il valore di p è stato calcolato con il test  $\chi^2$ .



Caratteristiche		Glut1 pos	Glut1 neg	p
Età	≤ 65	23 (52%)	26 (32%)	0.035*
	≥ 66	21 (48%)	55 (68%)	
Sesso	Uomini	23 (52%)	34 (42%)	0.3474
	Donne	21 (48%)	47 (58%)	
Sede	colon destro	18 (41%)	35 (43%)	0.0794°
	trasverso	6 (14%)	7 (9%)	
	colon sinistro	15 (34%)	16 (20%)	
	retto	5 (11%)	23 (28%)	
Dukes	A	11 (25%)	17 (21%)	0.1621°
	B	11 (25%)	34 (42%)	
	C	22 (50%)	30 (37%)	
Colloide	sì	8 (18%)	24 (30%)	0.2003
	no	36 (82%)	57 (70%)	
mhERG1	positivi	14 (32%)	14 (17%)	0.0746*
	negativi	30 (68%)	67 (83%)	
VEGF	positivi	39 (89%)	62 (77%)	0.1527
	negativi	5 (11%)	19 (23%)	
CAIX	positivi	14 (38%)	30 (34%)	0.6874
	negativi	23 (62%)	58 (66%)	

Tabella 13: associazione tra Glut1 ed i maggiori fattori clinici. ° Il valore di p è stato calcolato con il test  $\chi^2$ . \*correlazioni statisticamente significative.

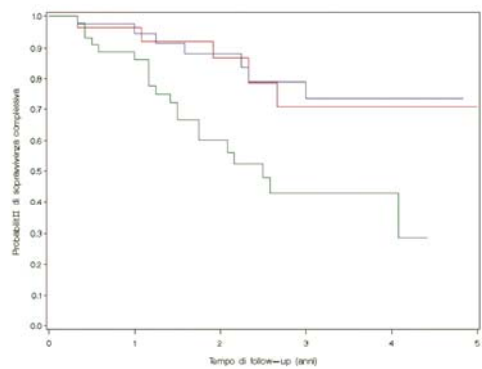
Caratteristiche		CAIX pos	CAIX neg	p
Età	≤ 65	16 (43%)	33 (37.5%)	0.5544
	≥ 66	21 (57%)	55 (62.5%)	
Sesso	Uomini	16 (43%)	41 (47%)	0.8445
	Donne	21 (57%)	47 (53%)	
Sede	colon destro	22 (59%)	31 (35%)	0.0709°
	trasverso	4 (11%)	9 (10%)	
	colon sinistro	6 (16%)	25 (29%)	
	retto	5 (14%)	23 (26%)	
Dukes	A	6 (16%)	22 (25%)	0.0831°
	B	10 (27%)	35 (40%)	
	C	21 (57%)	31 (35%)	
Colloide	sì	12 (32%)	20 (23%)	0.2693
	no	25 (68%)	68 (77%)	
mhERG1	positivi	11 (30%)	17 (19%)	
	negativi	26 (70%)	71 (81%)	
VEGF	positivi	33 (89%)	68 (77%)	0.1427
	negativi	4 (11%)	20 (23%)	
Glut1	positivi	14 (38%)	30 (34%)	0.6874
	negativi	23 (62%)	58 (66%)	

Tabella 14: associazione tra CAIX ed i maggiori fattori clinici. ° Il valore di p è stato calcolato con il test  $\chi^2$ .

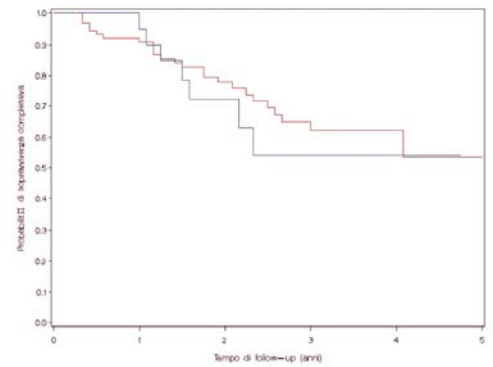
Dalla valutazione statistica sono emersi risultati interessanti. L'espressione di CAIX non ha evidenziato correlazioni significative con parametri clinici, né con parametri di stadiazione né con la sopravvivenza. VEGF ha mostrato una forte correlazione con l'espressione di hERG1, questo dato però non fornisce un contributo all'analisi statistica, di conseguenza l'impatto del fattore angiogenetico in questo tipo di analisi è da considerarsi nullo. Per quanto concerne l'espressione di hERG1 l'analisi sulla sopravvivenza indica un andamento leggermente migliore, intorno al 70%, nei pazienti hERG1-negativi, contro il 67% dei pazienti hERG1-positivi. Viceversa i pazienti Glut1-positivi hanno una sopravvivenza migliore (77%) rispetto a quelli Glut1-negativi (64%). Questo dato viene confermato dall'analisi univariata, in cui emerge una tendenza positiva, ma non statisticamente significativa ( $P=0.29$ ), verso una sopravvivenza migliore (78%) nei pazienti negativi per hERG1 se paragonata alla sopravvivenza dei pazienti positivi (67%). L'espressione di Glut1 correla positivamente ( $P=0.10$ ) con la sopravvivenza, ma in maniera inversa; infatti tendono ad una prognosi migliore i pazienti con espressione del trasportatore (83%), mentre la sopravvivenza peggiora (76%) in pazienti senza espressione.

L'analisi multivariata per hERG1/Glut1 aggiustata per stadi di Dukes conferma ulteriormente questi dati e li mette in relazione tra loro. Si evidenzia quindi un aumento del rischio in quei pazienti che mostrano bassa espressione del trasportatore e contemporaneamente una alta espressione del canale hERG1. In conclusione: il rischio di ridotta sopravvivenza si associa in maniera significativa ( $P=0.036$ ) ad una iperespressione del canale ed alla contemporanea ipo-espressione di Glut1; l'espressione di Glut1 diminuisce il rischio di una prognosi infausta ( $P<0.05$ ).

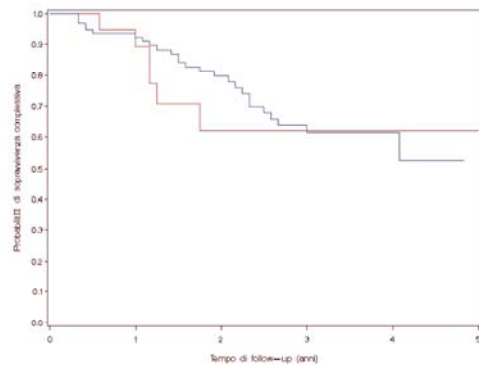
Di seguito vengono riportate le curve di sopravvivenza secondo il metodo Kaplan-Meier (figura 8) per i pazienti suddivisi per stadi di Dukes e in relazione all'espressione dei marcatori, che hanno evidenziato correlazioni statisticamente significative.



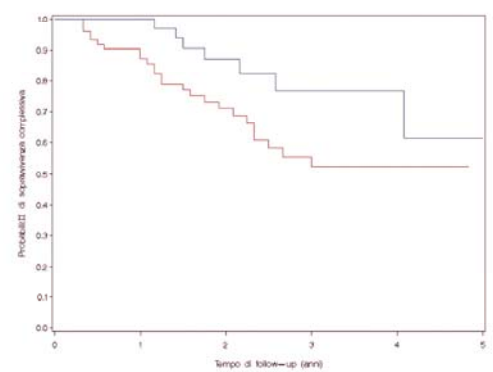
**A**



**B**



**C**



**D**

Figura 8: Curve di sopravvivenza secondo il metodo Kaplan- Meier. **A** : curve di sopravvivenza in relazione allo stadio di Duke: linea rossa – stadio A, linea blu – stadio B, linea nera – stadio C. **B** : curve di sopravvivenza in relazione all'espressione di hERG1: linea rossa – mhERG1 negativo, linea blu – mhERG1 positivo. **C** : curve di sopravvivenza in relazione all'espressione di VEGF: linea rossa – VEGF negativo, linea blu – VEGF positivo. **D** : curve di sopravvivenza in relazione all'espressione di Glut1: linea rossa – Glut1 negativo, linea blu – Glut1 positivo.

## ***DISCUSSIONE***

Da quanto emerso in questo studio hERG1, VEGF, CAIX e Glut1, in accordo con quanto documentato in letteratura, sono espressi a vari livelli negli adenocarcinomi del colon-retto.

L'analisi dell'espressione del canale del potassio hERG1 ha evidenziato una correlazione statistica fortemente significativa con l'espressione di VEGF. Questi dati sono in accordo con i risultati ottenuti da Crociani (Crociani O et al., lavoro in via di pubblicazione), in cui è stata evidenziata la stretta relazione tra hERG1 e VEGF in varie forme neoplastiche, in accordo anche con i dati pubblicati sul ruolo del canale nella regolazione della secrezione del fattore angiogenico (Masi A et al., 2005). La significativa correlazione tra l'espressione di hERG1 e VEGF, non correla statisticamente con parametri di stadiazione o di sopravvivenza e non si candida ad un ruolo prognostico indipendente. Tuttavia potrebbe indicare una via segnalatoria utilizzabile come ulteriore bersaglio terapeutico in quelle neoplasie in cui si evidenzia una overespressione di entrambi i fattori. Recentemente Dolderer (Dolderer JH et al., 2009) ha suggerito l'individuazione dell'espressione di hERG1 nei tumori del colon-retto per una terapia mirata con inibitori specifici del canale.

I risultati sull'espressione di Glut1 si sono rivelati interessanti. È stata dimostrata una correlazione inversa fortemente significativa tra hERG1 ed il trasportatore di glucosio. L'analisi statistica ha infatti evidenziato correlazioni altamente significative con i dati di sopravvivenza. La relazione tra l'espressione del trasportatore di glucosio ed un outcome migliore è emersa in modo rilevante e statisticamente significativo soprattutto come diminuzione del rischio negli stadi precoci della malattia. In base ai dati sull'analisi della sopravvivenza dei pazienti inclusi in questo studio, si può ipotizzare il valore prognostico positivo di Glut1. Ampia parte della letteratura ritiene che l'espressione del

trasportatore di glucosio possa essere considerato un fattore prognostico negativo indipendente (Haber RS et al., 1998), poiché fortemente correlato all'interessamento linfonodale. Inoltre l'aumento dell'espressione della proteina è associato al progredire dello stadio della malattia (Sakashita M et al., 2000) tanto da suggerirne l'utilizzo come bersaglio terapeutico (Chung FY et al., 2009).

I risultati dello studio riportato nella presente tesi di dottorato tendono a confermare quanto pubblicato recentemente da Cleven (Cleven AGH et al., 2007), i cui risultati dimostrano una correlazione fortemente significativa tra l'espressione di Glut1 e la sopravvivenza di pazienti con adenocarcinoma del colon-retto, seguiti con un follow-up di 14 anni.

Ancora oggi la valenza prognostica di Glut1 appare controversa, tuttavia si può ipotizzare che in stadi precoci della malattia stimoli ipossici nel micro-ambiente tumorale stimolino l'espressione del trasportatore di glucosio, il quale nelle prime fasi costituisce un fattore inibente per la progressione neoplastica. In un secondo momento l'attivazione del metabolismo glicolitico e l'incremento dell'up-take di glucosio potrebbero determinare una diminuzione dell'espressione di Glut1 ed un attivazione della risposta neoangiogenetica.

Da quanto emerso in questo studio si può ipotizzare una interazione indiretta tra il canale hERG1 e Glut1. La diminuzione dell'espressione del trasportatore di glucosio potrebbe essere associata ad un aumento della tensione di ossigeno (ripristino delle condizioni normossiche) dovuto all'attivazione della risposta angiogenetica ad opera di VEGF e regolata dall'azione del canale hERG1, ciò determinerebbe l'acquisizione di un fenotipo più marcatamente aggressivo. Sulla base di queste osservazioni si può proporre un modello come riportato in figura 9.

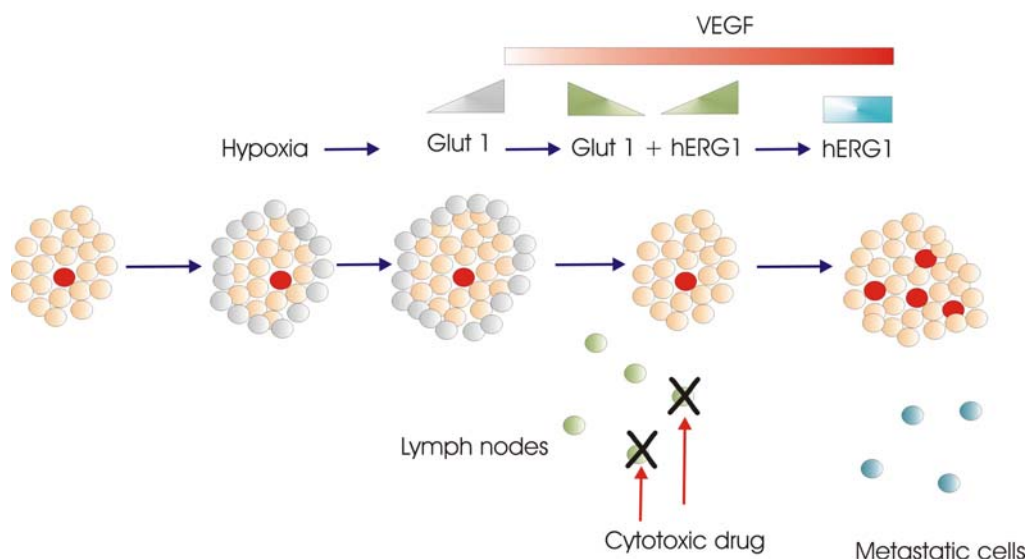


Figura 9: diversa espressione di Glut1, hERG1 e VEGF in adenocarcinoma del colon-retto, ipotesi di lavoro (Arcangeli A).

L'osservazione delle curve di sopravvivenza relative all'espressione di Glut1, da solo ed in associazione con hERG1, può suggerire la possibilità di identificare gruppi di pazienti con migliore outcome e che potranno essere indirizzati a protocolli chemioterapici mirati. Dal punto di vista clinico l'individuazione di uno specifico pattern molecolare potrebbe evidenziare l'esistenza di gruppi di pazienti con neoplasie caratterizzate da uno specifico comportamento biologico, tale da influenzare la progressione della malattia e poterne quindi predire la responsività ai protocolli terapeutici mirati.

Complessivamente da quanto emerso dai dati riportati in questa tesi l'individuazione di uno o più marcatori specifici per una particolare via segnalatoria o di un pattern molecolare può indicare nuovi bersagli per terapie biologiche, da associare alla terapia classica in protocolli integrati; inoltre la rilevazione, con tecniche di uso comune nei laboratori diagnostici, di marcatori molecolari, come hERG1, VEGF e Glut1, utilizzabili come marcatori specifici può rappresentare un valido supporto per una migliore stratificazione dei pazienti con malattie neoplastiche resistenti ai trattamenti di cura classici.

## **BIBLIOGRAFIA**

Ackerman MJ, Claphman DE "Ion channels - basic science and clinical disease" *N Engl J Med*, 1997; 336: 1575-1586

Airley R, Loncaster J, Davidson S, Bromley M, Roberts S, Patterson A, Hunter R, Stratford I, West C "Glucose transporter Glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix" *Clin Canc Res*, 2001; 7: 928-934

American Gastroenterological Association "AGA technical review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence" *Gastroenterology*, 2000; 118: 1235-1257

Andr  T, Kotelevets L, Vaillant J-C, Coudray AM, Weber L, Pr vot S, Parc R, Gespach C, Chastre E "VEGF, VEGF-B, VEGF-C, and their receptors KDR, Flt-1 and Flt-4 during the neoplastic progression of human colonic mucosa" *Int J Cancer*, 2000; 86: 174-181

Arcangeli A, Becchetti A, Mannini A "Integrin mediated neurite outgrowth in neuroblastoma cells depends on the activation of potassium channels" *J Cell Biol*, 1993; 122:1131-1143

Arcangeli A, Bianchi L, Becchetti A, Faravelli L, Coronello M, Mini E, Olivotto M, Wanke E "A novel inward-rectifying K<sup>+</sup> current with a cell cycle dependance governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells" *J Phys*, 1995; 489: 455-471

Arcangeli A "Expression and role of hERG channels in cancer cells" In: The ERG cardiac potassium channel: structure, function, and long QT syndrome Wiley, Chirchester (Novartis Foundation Symposium 266), 2005; 225-234

Arcangeli A, Becchetti A, "Ion channels and cell proliferation" In "Janigro D (ed) *Cell cycle in the central nervous system*" Human Press, New Jersey 2006

Ashida S, Nishimori I, Tanimara M, Onishi S, Shuin T "Effects of von Hippel-Lindau gene mutation and methylation status on expression of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma" *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002; 128: 561-568



Astler VB, Collier FA "The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum" *Ann Surg*, 1954; 139: 846-852

Bader S, Walker M, McQueen HA, Sellar R, Oei E, Wopereis S, Zhu Y, Peter A, Bird AP, Harrison DJ "MD1, MBD2 and CGBP genes at chromosome 18q21 are infrequently mutated in human colon and lung cancer" *Oncogene*, 2003; 22:3506

Barker N, Clevers H "Tumor environment: a potent driving force in colorectal cancer?" *Trends in Molecular Medicine*, 2001; 7:535-537

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D "Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor Flt-1" *Blood*, 1996; 87: 3336-3343

Behrooz A, Isail Beigi F "Dual control of glut-1 glucose transporter gene expression by hypoxia and by inhibition of oxidative phosphorylation" *J Biol Chem*, 1997; 272:5555-5562

Bianchi L, Wible B, Arcangeli A, Taglialatela M, Morra F, Castaldo P, Crociani O, Rosati B, Faravelli L, Olivetto M, Wanke E "*herg* encodes a K<sup>+</sup> current highly conserved in tumors of different histogenesis; a selective advantage for cancer cells?" *Cancer Res*, 1998; 58: 815-822

Binggeli R, Weinstein RC "Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions" *J Theor Biol*, 1986; 123: 377-401

Birnbaum MJ, Haspel HC, Rosen OM "Cloning and characterization of a cDNA encoding rat brain glucose transporter protein" *Proc Nat Acad Sci USA*, 1986; 83(16): 5784-5788

Boland CR "Roles of the DNA mismatch repair genes in colorectal tumorigenesis" *Int J Cancer*, 1996; 69: 47-49

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B "Prevalence of *ras* gene mutations in human colorectal cancers" *Nature*, 1987; 327: 293-297

Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF "Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract" *Cancer Res*, 1993; 53: 4727-4735

Brown RS, Wahl RL "Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer" *Cancer*, 1993; 72: 2979-2985

Brown JM, "The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy-eighteenth Bruce F.Cain Memorial Award lecture" *Can Res*, 1999; 59: 5863-5870

Burkitt DP "Epidemiology of cancer of the colon and rectum" *Cancer*, 1971; 28:3-13

Cao D, Hou M, Guan YS, Jiang M, Yang Y, Gou FG "Expression of HIF1-alpha and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications" *BMC Cancer*, 2009; 9:432-441

Cascinu S, Graziano F, Catalano V, Barni S, Giordani P, Baldelli AM, Staccioli MP, Rossi C, Brenna A, Valenti A, Muretto P, Catalano G: "Vascular Endothelial Growth Factor and p53 Expressions in Liver and Abdominal Metastases from Colon Cancer" *Tumor Biol* 2003;24:77-81

Chen R, Rabinovitch PS, Crispin DA, Edmond MJ, Koprowicz KM, Brommer MP, Brentnall TA: "DNA fingerprinting abnormalities can distinguish ulcerative colitis patients with dysplasia and cancer from those who are dysplasia/cancer-free" *Am J Pathol*, 2003; 162:665

Cherubini A, Taddei GL, Crociani O, Paglierani M, Buccoliero AM, Fontana L, Noci I, Borri P, Borrani E, Giachi M, Becchetti A, Rosati B, Wanke E, Olivotto M, Arcangeli A "HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium" *Br J Cancer*, 2000; 83: 1722-1729

Chiche J, Ilc K, Laferriere J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM, Brahimi Horn MC, Pouyssegur J "Hypoxia Inducible Carbonic Anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH" *Cancer Res*, 2009; 69: 358-368

Chia SK, Wykoff CC, Watson PH, Han C, Leek RD, Pastorek J, Gatter KC, Ratcliffe P, Harris AL "Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma" *J Clin Oncol*, 2001; 19: 3660-3668

Chow WH, Malaker HS, Hsing AW "Occupational risks for colon cancer in Sweden" *J Occup Med*, 1994; 36: 647-651

Chung FY, Huang MY, Yeh CS, Chang HJ, Cheng TL, Yen LC, Wang JY, Lin SR "GLUT1 gene is a potential hypoxic marker in colorectal cancer patients" *BMC Cancer*, 2009; 9:241-252

Cleven AHG, van Engeland M, Wouters BG, de Bruijne AP "Stromal expression of hypoxia regulated proteins is an adverse prognostic factor in colorectal carcinomas" *Cellular Oncology*, 2007; 29: 229-240

Coleman MP, Estève J, Damiecki P, Arslan A, Renard H "Trends in cancer incidence and mortality" *IARC Scientific Publications*, International Agency for Research on Cancer, Lyon 1993; 121

Correa P, Miller MJS "Carcinogenesis, apoptosis and cell proliferation" *Br Med Bull*, 1998; 54:151-162

Crociani O, Guasti L, Balzi M, Becchetti A, Wanke E, Olivotto M, Wymore RS, Arcangeli A "Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells" *J Biol Chem*, 2003; 278: 2947-2955

Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT "A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome" *Cell*, 1995, 80: 795-780

Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR "Regulation of ion channels by integrins" *Cell Biochem Biophys* 2003, 36:41-66

DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Calahan MD "Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis?" *Nature*, 1984; 465-468

Dedek K, Waldegger S "Colocalization of KCNQ1/KCNE channel subunits in the mouse gastrointestinal tract" *Pflügers Arch-Eur J Physiol*, 2001; 442: 896-902

de la Chapelle A "Genetic predisposition to colorectal cancer" *Nature Rev*, 2004; 4: 769-780

Dolderer JH, Schuldes H, Bockhorn H, Altmannsberger M, Lambers C, von Zabern D, Jonas D, Schwegler H, Linke R, Schröder UH "HERG1 gene expression as a specific tumor marker in colorectal cancer" article in press *EJSO*, 2009

Dorudi S, Sheffield JP, Poulson R, Northover JM, Hart IR "E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study" *Am J Pathol*, 1993; 142: 981-986

Dukes CE "The classification of cancer of the rectum" *J Path & Bact*, 1932; 35: 323-332

Edwards BK, Howe HL, Ries LAG "The annual report to the nation on the status of cancer 1973-1999 featuring implications of age and aging on US cancer burden" *Cancer*, 2002; 94:2766-2792

Elder JP, Castro FG, DeMoor C "Differences in cancer risk-related behaviors in Latino and Anglo adults" *Prev Med*, 1991; 20:751-763

Fearon ER, Vogelstein B "A genetic model for colorectal tumorigenesis" *Cell*, 1990; 61:759-767

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene" *Nature*, 1996; 380: 439-442

Ferrara N "Vascular endothelial growth factor" *Eur J Cancer*, 1996a; 32A: 2413-2422

Ferrara N "Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor" *J Mol Med*, 1999; 77: 527-543

Folkman J, Shing Y "Angiogenesis" *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-10934

Font A, Abad A, Monzó M, Sanchez JJ, Guillot M, Manzano JL, Piñol M, Ojanguren I, Rosell R "Prognostic value of K-ras mutations and allelic imbalance on chromosome 18q in patients with resected colorectal cancer" *Dis Colon Rectum*, 2001; 549-557

Fontana L, D'Amico M, Crociani O, Biagiotti T, Solazzo M, Rosati B, Arcangeli A, Wanke E, Olivetto M "Long-term modulation of HERG channel gating in hypoxia" *Biophys Res Commun*, 2001; 286: 857-862

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL "activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by Hypoxia Inducible Factor 1" *Mol Cell Biol*, 1996; 16:4604-4613

Fuchs CS, Willett CS, Colditz GA "The influence of folate and multivitamin use on the familial risk of colon cancer in women" *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002; 11:227-234

Fukumoto, H., Seino, S., Imura, H., Seino, Y. & Bell, G.I. "Characterization and expression of human HepG2/erythrocyte glucose-transporter gene" *Diabetes*, 1988; 37: 657-661

Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ "Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis" *N Engl J Med*, 1993; 328: 1313-1316

Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Pastorek J, Wykoff CC, Gatter KC, Harris AL "Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer" *Cancer Res*, 2001; 61: 7992-7998  
Giovannucci E "Obesity, gender and colon cancer" *Gut*, 2002; 51: 147

Goldberg MS, Parent ME, Siemiatycki J "A case-control study of the relationship between the risk of colon cancer in men and exposures to occupational agents" *Am J Ind Med*, 2001; 39: 531-546

Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR "Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability" *Can Res*, 2003; 63 (7): 1608.

Greijer AE, Delis van Diemen PM, Fijnemann RJA, Giles RH, Voest EE, van Hisenberg VWM, Meijer GA "Presence of HIF1 and related genes in normal mucosa, adenomas and carcinomas of the colorectum" *Virchows Arch*, 2008; 452:535-544

Haber RS, Rathan A, Weiser KR, Pritsker A, Itzowitz SH, Bodian C, Slater G, Weiss A, Burstein DE "Glut-1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma" *Cancer*, 1998; 83:34-40

Harris AL "Hypoxia-a key regulatory factor in tumor growth" *Nat Rev Cancer*, 2001; 2:38-46

Harrison's Principles of Internal Medicine, XIV ed., McGraw-Hill Companies Inc., 1998

Hebbar M, Wacrenier A, Desauw C, Romano O, Cattani S, Triboulet JP, Pruvot FR "Lack of usefulness of epidermal growth factor receptor expression determination of cetuximab therapy in patients with colorectal cancer" *Anticancer Drug*, 2006; 17:855-857

Hofman G, Bernabei PA, Crociani O, Cherubini A, Guasti L, Pillozzi S, Lastraioli L, Polvani S, Bartolozzi B, Solazzo V, Gragnani L, Defilippi P, Rosati B, Wanke E, Olivetto M, Arcangeli A "HERG K<sup>+</sup> channels activation during  $\beta$ 1 integrin-mediated adhesion to fibronectin induces up-regulation of  $\alpha$ (v)  $\beta$ 3 integrin in the preosteoclastic leukemia cell line FLG 29.1" *J Biol Chem*, 2001; 276:4923-4931

Houck KA; Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW "The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA" *Mol Endocrinol*, 1991; 5: 1806-1814

Imamura T, Kikuchi H, Herraiz MT, Park DY, Mizukami Y, Mino Kenduson M, Lynch MP, Rueda BR, Benita Y, Xavier RJ, Chung DC "HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  have a divergent role in colon cancer" *Int J Canc*, 2009; 124: 763-771

ITT "Raccomandazioni per i principali tumori solidi: tumori della mammella, del polmone, del colon-retto, della prostata e ginecologici" 2005

Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, Pack S, Geil L, Johnson BE, Stanbridge EG, Lerman MI "Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes" *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 12596-12601

Ivanov S, Liao S-Y, Ivanova A, Danilkovitch-Magkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, Zavada J, Waheed A, Sly W, Lerman MI, Stanbridge EJ "Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer" *Am J Pathol*, 2001; 158: 905-919

Jass JR "Pathogenesis of colorectal cancer" *Surg Clin N Am* 2002; 82:891

Jass JR, Love SB, Northover JMA "A new prognostic classification of rectal cancer" *Lancet*, 1987; ii : 1303-1306

Jass JR "Epithelial and mesenchymal tumours of the small and large bowel" In Oxford Textbook of Pathology, Mc Gee JO, Isaacson PG, Wright NA ed. 1992

Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M "Cancer statistics 2002" *CA Cancer J Clin* 2002; 52:23-47

Kaluz S, Kaluzova M, Opavsky R, Pastorekova S, Gibadulinova A, Dequiedt F, Kettmann R, Pastorek J "Transcriptional regulation of the MN/CA9 gene coding for the tumor-associated carbonic anhydrase IX. Identification and characterization of a proximal silencer element" *J Biol Chem*, 1999; 274: 32588-32595

Kivelä AJ, Parkkila S, Saarnio J, Karttunen TJ, Kivelä J, Parkkila AK, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Rajaniemi H "Expression of transmembrane carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in normal human pancreas and pancreatic tumours" *Histochem Cell Biol*, 2000; 114: 197-204

Kivelä AJ, Saarnio J, Karttunen TJ, Kivelä J, Parkkila AK, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Parkkila S, Rajaniemi H "Differential expression of cytoplasmic carbonic anhydrases, CA I and II, and membrane-associated isozymes, CA IX and XII in normal mucosa of large intestine and in colorectal tumors" *Dig Dis Sci*, 2001; 46: 2179-2186

Kumar H, Heer K, Lee PW, Duthie GS, MacDonald AW, Greenman J, Kerin MJ, Monson JR "Preoperative serum vascular endothelial growth

factor (VEGF) can predict stage in colorectal cancer" *Clin Can Res*, 1998; 4:1279-1285

Lastraioli E, Guasti L, Crociani O, Polvani S, Hofmann G, Witchel H, Bencini L, Calistri M, Messerini L, Scatizzi M, Moretti R, Wanke E, Olivotto M, Mugnai G, Arcangeli A "herg1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells" *Cancer Res*, 2004; 64: 606-611

Li H, Chen Q, Moss AJ, Robinson J, Goytia V, Perry JC, Vincent M, Priori S, Lehmann MH, Denfield SW, Duff D, Kaine S, Shimizu W, Schwartz PJ, Wang Q, Towbin JA "New mutations in the KvLQT1 potassium channel that cause long-QT syndrome" *Circulation*, 1998; 97: 1264-1269

Listrom MB, Little JV, McKinley M, Fenoglio-Preiser CM "Immunoreactivity of tumor-associated glycoprotein (TAG-72) in normal, hyperplastic and neoplastic colon" *Hum Pathol*, 1989; 20:994-1000

Longnecker MP, Orza MJ, Adams ME "A meta-analysis of alcoholic beverage consumption in relation to risk of colorectal cancer" *Cancer Causes Control*, 1990; 1: 59-68

Lynch HT, Guirgis HA, Lynch PM, Lynch JF, Harris RE "Familial cancer syndromes: a survey" *Cancer (Suppl)*, 1977; 39: 1867-1881

Lynch HT, de la Chapelle A "Genomic medicine: hereditary colon cancer" *N Engl J Med*, 2003; 348: 919-932

Madan A, Curtin PT "A 24-base pair sequence 3' to the human erythropoietin contains a hypoxia-responsive transcription enhancer" *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90: 3928-3932

Martinez ME, Grodstein F, Gionvannucci E "A prospective study of reproductive factors, oral contraceptive use, and risk of colorectal cancer" *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1997; 6: 1-5

Masi A, Becchetti A, Restano Casullini R, Polvani S, Hofmann G, Buccoliero AM, Paglierani M, Pollo B, Taddei GL, Gallina P, Di Lorenzo N, Franceschetti S, Wanke E, Arcangeli A "hERG1 channels are overexpressed in glioblastoma multiforme and modulate VEGF secretion in glioblastoma cell lines." *Brit J Canc*, 2005; 93:781-792

Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR "A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit" *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 9026-9030

Mellan P, Minn H, Grenman R, Harkonen P "Expression of glucose transporter in head and neck tumors" *Int J Canc*, 1994; 56:622-629

Minato E, Miki C, Tanaka K, Kobayashi M, Mohri Y, Tonouchi H, Kuribayashi K, Kusunoki M "Vascular endothelial growth factor as an age-dependent prognostic factor in gastric cancer" *Am J Surg*, 2002; 184:460-464

Morais Cabral JH, Lee A, Cohen SL, Chait BT, Li M, Mackinnon R "Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain" *Cell*, 1998; 95: 649-655

Murakami Y, Kanda K, Tsuji M, Kanayama H, Kagawa S "MN/CA9 expression as a potential biomarker in renal cell carcinoma" *BJU International*, 1999; 83: 743-747

Norrby K "Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control" *APMIS* 1997; 105: 417-437

Nagao K, Hisatomi H, Hirata H, Yamamoto S, Su SL, Boynton AL, Holmes HE, Elgamal AA, Murphy GP "Expression of molecular marker genes in various types of normal tissue: implication for detection of micrometastases" *Int J Mol Med*, 2002; 10: 307-310

Nagase Y, Tarata K, Moriyama N, Aso Y, Muratami T, hirano H, "Immunoistochemical localization of glucose transporters in human renal cell carcinoma" *J Urol*, 1995; 153:798-801

Opavsky R, Pastorekova S, Zelnik V, Gibadulinova A, Stanbridge EJ, Zavada J, Kettmann R, Pastorek J "Human MN/CA9 gene a novel member of carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationship" *Genomics*, 1996; 3:480-487

Paoletti R, Nicosia S, Clementi F, Fumagalli "Farmacologia generale e colecolare" 2004; III edizione, UTET

Pardo LA, delCamino D, Sanchez A "Oncogenic potential of EAG K<sup>+</sup> channels in neoplastic hemopoietic cells" *EMBO J* 1999, 18:5540-5547

Pastorekova S, Zavadova Z, Kostal M, Babusikova O, Zavada J "A novel quasi-viral antigen agent, MaTu, is a two-component system" *Virology*, 1992; 187:620-626

Pastorekova S, Parkkila S, Parkkila AK, Opavsky R, Zelnik V, Saarnio J, Pastorek J "Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts" *Gastroenterology*, 1997; 112: 398-408



Park JE, Chen H, Winer J, Houck KA, Ferrara N "Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity to Flt-1 but not to Flk-1/KDR" *J Biol Chem*, 1994; 269: 25646-25654

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R "Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells" *Biochem Biophys Res Commun*, 1991; 181: 902-906

Pillozzi S, Brizzi MF, Balzi M, Crociani O, Cherubini A, Guasti L, Bartolozzi B, Becchetti A, Wanke E, Bernabei PA, Olivotto M, Pegoraro L, Arcangeli A "HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors" *Leukemia* 2002; 16: 1791-1798

Pond AL, Scheve BK, Benedict AT, Petrecca K, Van Wagoner DR, Shrier A, Nerbonne JM "Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional  $I_{Kr}$  channels" *J Biol Chem*, 2000; 275: 5997-6006

Potter JD "Colorectal cancer: molecules and populations" *J Natl Cancer Inst*, 1999; 91: 916-932

Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zheng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A "Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia inducible factor I alpha" *Genes Dev*, 2000; 14:34-44

Ries LAG, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Edwards BK "SEER Cancer Statistics Review, 1973-1999, Bethesda MD" *National Cancer Institute*, 2002

Robbins e Cotran "Le basi patologiche delle malattie"

Robinson CJ, Stringer SE "The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors" *J Cell Science*, 2001; 114: 853-865

Rodriguez-Bigas MA, Lin EH, Crane CH "Adenocarcinoma of the colon and the rectum" In: *Holland, Frei "Cancer Medicine 6"* BC Decker, 2003

Rosai J "Ackerman's surgical pathology 8<sup>th</sup> edition" *Mosby Ed*, 1996

Rose DIP, Boyar AP, Wynder EL "International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate and colon, and per capita food consumption" *Cancer*, 1986; 58: 2363-2371

Rosen DM "Arrhythmogenic potential of class III antiarrhythmic agents: comparison with class I agents" In: *Control of cardiac arrhythmias by*

lengthening repolarization, *BN Singh ed.*, Mount Kisko New York, Futura Publishing Company, 1988

Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, Waheed A, Casey MC, Zhou XY, Pastorekova S, Pastorek J, Karttunen T, Haukipuro K, Kairaluoma MI, Sly WS "Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity" *J Histochem Cytochem*, 1998; 46: 497-504

Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, Haukipuro K, Pastorekova S, Pastorek J, Kairaluoma MI, Karttunen TJ "Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation" *Am J Pathol*, 1998; 153: 279-285

Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, Pastorekova S, Haukipuro K, Pastorek J, Juvonen T, Karttunen TJ "Transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, is a potential biomarker for biliary tumours" *J Hepatol*, 2001; 35: 643-649

Sakashita M, Aoyama N, Minami R, Maekawa S, Kuroda K, Shirasaka D, Ichihara T, Kuroda Y, Maeda S, Kasuga M "Glut1 expression in T1 eT2 stage colorectal carcinomas: its relationship to clinical pathological features" *European Journal of Cancer*, 2000; 37:204-209

Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT "A mechanistic link between an inherited and acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the  $I_{Kr}$  potassium channel" *Cell*, 1995; 81: 299-307

Sansone P, Piazzini G, Paterini P, Strillacci A, Ceccarelli C, Minni F, Biasco G, Chieco P, Bonafè M "Cyclo-oxygenase 2/Carbonic anhydrase IX up-regulation promotes invasive potential and hypoxia survival in colorectal cancer" *J CMM*, 2008

Schönherr R, Heinemann SH "Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel" *J Physiol (Lond)*, 1996; 493: 635-642

Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, Shibuya MA "Unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF" *Oncogene*, 1995; 10: 135-147

Semenza GL, Wang GL, "A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation" *Mol Cell Biol*, 1992; 12: 5547-5554

Semenza GL "targeting HIF1 $\alpha$  for cancer therapy" *Nat Rev Cancer*, 2003; 3:721-732

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid" *Science*, 1983; 219: 983-985

Silverman AL, Park JG, Hamilton SR, Gazdar AF, Luk GD, Baylin SB "Abnormal methylation of the calcitonin gene in human colonic neoplasms" *Cancer Res*, 1989; 49: 3468-3473

Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M "Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family" *Oncogene*, 1990; 5: 519-524

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis" *Nature*, 1992; 359: 843-845

Shows, T, Eddy RL, Byers MG, Fukushima Y, Dehaven CR, Murray JC, Bell GI "Polymorphic human glucose transporter gene (GLUT) is on chromosome 1p31.3-p35" *Diabetes*, 1987; **36**: 546-549

Simiontonaki N, Taxeidis M, Jayasinghe C, Kurzik-Dumke U, Kirkpatrick CJ "Hypoxia inducible factor 1  $\alpha$  expression increases during colorectal carcinogenesis and tumor progression" *BMC Canc*, 2008; 8:320

Smith GAM, Tsui H-W, Newell E, Jiang X, Zhu X-P, Tsui FWL, Schlichter LC "Functional up-regulation of HERG K<sup>+</sup> channels in neoplastic hematopoietic cells" *J Biol Chem* 2002; 277:18528-18534

Smith PL, Baukrowitz T, Yellen G "The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel" *Nature*, 1996; 379: 833-886

Spector PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC "Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Open-channel block by methanesulfoanilides" *Circ Res*, 1996; 78: 499-503

Su TS, Tsai TF, Chi CW, Han SH, Chou CK "Elevation of facilitated glucose transporter messenger RNA in human hepatocellular carcinoma" *Hepathology*, 1990; 11:118-122

Suessbrich H, Schönherr R, Heinemann SH, Lang F, Busch AE "Specific block of cloned Herg channels by clofilium and its tertiary analog LY97241" *FEBS Lett*, 1997; 414: 435-438

Steinbach G, Lynch PM, Phillips RKS "The effect of celecoxib, a cyclooxygenase inhibitor on familial adenomatous polyposis" *N Engl J Med*, 2000; 342: 1946-1952

Takedo MM, Takaku K "gastro-intestinal tumorigenesis in Smad4 mutant mice" *Cytokine Growth Factro rev.*, 2000; 11:147

Tanaka T, Nagai R, Tomoike H, Takata S, Yano K, Yabuta K, Haneda N, Nakano O, Shibata A, Sawayama T, Kasai H, Yasaki Y, Nakamura Y "Four novel KvLQT1 and four novel HERG mutations in familial long-QT syndrome" *Circulation*, 1997; 95: 565-567

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA "The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing" *J Biol Chem*, 1991; 266: 11947-11954

Tripp BC, Smith K, Ferry JG "Carbonic anhydrases: new insights for an ancient enzyme" *J Biol Chem*, 2001; 276: 48615-48618

Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA "HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family" *Science*, 1995; 269: 92-95

Viloria CG, Barros F, Giráldez T, Gòmez-Varel D, de la Peña P "Differential effects of amino-terminal distal and proximal domains in the regulation of human *erg* K<sup>+</sup> channel gating" *Biophys J*, 2000; 79: 231-246

Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G "Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3" *Circulation*, 1996; 93: 1493-1495

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL "Genetic alterations during colorectal tumor development" *N Engl J Med*, 1988; 319: 525-532

Wang H, Zhang Y, Cao L, Han H, Wang J, Yang B, Nattel S, Wang Z "HERG K<sup>+</sup> channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation" *Cancer Res* 2002; 62: 4843-4848

Warburg O "On the origins of cancer cells" *Science*, 1956; 123:309-314

Warmke JW, Ganetzky B "A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals" *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91: 3438-3442

Wong MP, Cheung N, Yuen ST, Leung SY, Chung LP "Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumor progression" *Int J Cancer*, 1999; 81: 845-850

World Cancer Report 2008

Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, koh G, Yano H, Inagaki N "Overexpression of facilitative glucose transporter genes in human cancer" *Bioch Biophys Res Commun*, 1990; 170:223-230

Younes M, Lechago LV, Lechago J "Overexpression of the human erythrocyte glucose transporter occurs as a late event in human colorectal carcinogenesis and is associated with an increased incidence of lymph-node metastasis" *Clin Canc*, 1996; 2:1151-1154

Yu JX, Cui L, Zhang QY, Chen H, Wei HJ, Ma HT " Expression of NOS and HIF-1 $\alpha$  in colorectal carcinoma and implication in tumor angiogenesis" *World J Gastreenterology*, 2006; 12:4660-4664

Yu SP "Regulation and critical role of potassium homeostasis I apoptosis " *Prog Neurobiol* 2003, 70:363-386